

**Consumo de algas marinas: su influencia
en el valor nutritivo de la dieta y en diversos
parámetros fisiológicos**



TESIS DOCTORAL

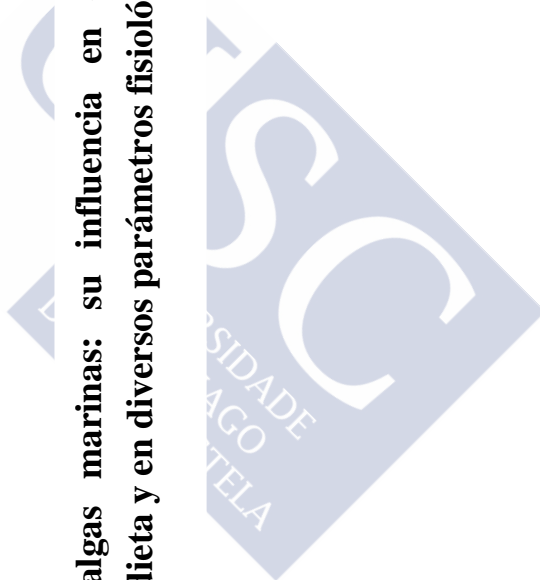
Rosendo Millán Lence

Santiago de Compostela, 2015



**Rosendo
Millán
Lence**

**Consumo de algas marinas: su influencia en el valor
nutritivo de la dieta y en diversos parámetros fisiológicos**







Departamento de Fisioloxía

FACULTADE DE BIOLOXÍA

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TESIS DOCTORAL



**Consumo de algas marinas: su influencia
en el valor nutritivo de la dieta y en diversos
parámetros fisiológicos**



Memoria presentada por:

ROSENDO MILLÁN LENCE

para optar al Grado de Doctor en Biología.

Santiago de Compostela 6 de Noviembre de 2015



DOÑA CRISTINA TABOADA MONTERO y DOÑA ISABEL MÍGUEZ BESADA PROFESORAS TITULARES DE FISIOLÓGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA.

INFORMAN:

Que la memoria experimental titulada **"Consumo de algas marinas: su influencia en el valor nutritivo de la dieta y en diversos parámetros fisiológicos"** ha sido elaborada bajo su dirección por Don Rosendo Millán Lence para optar al grado de Doctor y considerando que se halla concluida, autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, y surta los efectos oportunos, firman el presente informe en Santiago de Compostela a 6 de Noviembre de 2015

Fdo. Dra. Cristina Taboada Montero **Fdo.** Dra. Isabel Míguez Besada





La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Fisiología (Facultad de Farmacia) de la Universidad de Santiago de Compostela y fue parcialmente financiada en base a los proyectos de la Xunta de Galicia PGIDIT06TAL060E y PGIDIT08TAL004E.



A mis chicas Bea, Ana y Elena





En la formación científica y profesional influyen sobremanera las circunstancias personales, por esta razón tengo que expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas, que de una u otra forma, han influido en mi carrera profesional y en especial en la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar quisiera agradecer a mis directoras de Tesis, las profesoras Cristina Taboada e Isabel Míguez, sus consejos, su apoyo, su empuje, su disposición, su paciencia y un largo etcétera que hicieron posible la finalización de este trabajo, todo ello acompañado de un ambiente óptimo de trabajo y de relaciones personales.

A los profesores de la Universidad de Santiago de Compostela Asunción Lamas, Joaquín Espinosa, María Mancebo y Oscar García; a Santi, Lucía, Carmen, Rosa y Sara, por hacer que el Dep. de Fisiología de la Fac. de Farmacia no sólo sea un lugar de trabajo.

Al grupo de Invertebrados Marinos del Dep. de Zoología y Antropología de la Fac. de Biología, encabezado en su día por el Prof. Eugenio Fernández Pulpeiro y del que formaron parte, entre otros, Vicente, Javier, Oscar y Elena, por acompañarme en los inicios de mi etapa investigadora.

A Rosa Mirás, Antonio Muíños y Manuela Buján que a través de la empresa Porto-Muíños, con la colaboración del Prof. Javier Cremades (Universidad de La Coruña) y la empresa ANFACO-CECOPESCA fueron el complemento ideal para lograr la financiación necesaria por parte de la Xunta de Galicia.

A mis padres, Rosendo y Matilde, por su apoyo incondicional y sobre todo, por haberme dejado tomar mis propias decisiones aunque fueran equivocadas y estar siempre preparados para amortiguar sus efectos si así sucedía, por todos sus sacrificios y trabajo incansable, gracias.

A mis hijas Ana y Elena, porque la vida es mucho más entretenida desde que están ellas y porque parte de mí perdurará con ellas, os quiero.

A Bea, compañera de estudios, de inquietudes, de forma de vida y de familia. No sé qué hubiera sido de mí sin ti, te quiero.



Consumo de algas marinas: su influencia en el valor nutritivo de la dieta y en diversos parámetros fisiológicos

RESUMEN

En general, las algas marinas son una buena fuente de fibra al mismo tiempo que proporcionan vitaminas, minerales y nutraceuticos de interés para la alimentación humana. Por ello, en este estudio se analiza cómo influye la ingesta de las algas marinas *Porphyra purpurea*, *Undaria pinnatifida*, *Himanthalia elongata*, *Ulva rigida* y *Codium tomentosum* en la calidad nutritiva del alimento y en diversos parámetros hemáticos. Debido a que las enzimas implicadas en los procesos digestivos se adaptan a la dieta, se analiza el efecto del consumo de un alga verde, una parda y una roja en la actividad de las enzimas disacaridasas: maltasa, sacarasa y lactasa; así como en la actividad enzimática leucino aminopeptidasa y gamma-glutamyl transpeptidasa en mucosa intestinal, hígado y riñón, órganos fundamentales en el metabolismo. Teniendo en cuenta que la composición de las algas incluidas en la dieta puede modular la producción de radicales libres, se valora, en los órganos antes mencionados, su influencia sobre la peroxidación lipídica y sobre la actividad de enzimas antioxidantes tales como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, como mecanismo endógeno que protege del daño oxidativo.

PALABRAS CLAVE

Algas comestibles, composición, parámetros nutricionales, parámetros séricos, antioxidantes.

Consumo de algas mariñas: a súa influencia no valor nutritivo da dieta e en diversos parámetros fisiolóxicos

RESUMO

En xeral, as algas mariñas son unha boa fonte de fibra ó mesmo tempo que proporcionan vitaminas, minerais e nutracéuticos de interese para a alimentación humana. Por iso, neste estudo se analiza cómo inflúe a inxesta das algas mariñas *Porphyra purpurea*, *Undaria pinnatifida*, *Himanthalia elongata*, *Ulva rigida* e *Codium tomentosum* na calidade nutritiva do alimento e en diversos parámetros hemáticos. Debido a que as enzimas implicadas nos procesos dixestivos se adaptan á dieta, analízase o efecto do consumo dunha alga verde, unha parda e outra vermella na actividade das enzimas disacaridasas: maltasa, sacarasa e lactasa; así como na actividade enzimática de leucino aminopeptidasa e gamma-glutamyl transpeptidasa na mucosa intestinal, fígado e ril, órganos fundamentais no metabolismo. Tendo en conta que a composición das algas incluídas na dieta pode modular a produción de radicais libres, valórase, nos órganos antes mencionados, a súa influencia sobre a peroxidación lipídica e sobre a actividade de enzimas antioxidantes tales como superóxido dismutasa, catalasa e glutatión peroxidasa, como mecanismo endógeno que protexe do dano oxidativo.

PALABRAS CHAVE

Algas comestibles, composición, parámetros nutricionais, parámetros séricos, antioxidantes.

Seaweed consumption: its influence in the nutritional value of the diet and in various physiological parameters

SUMMARY

In general, seaweeds are a good source of fiber in addition to providing vitamins, minerals and nutraceuticals interesting for human consumption. Therefore, this paper analyzes how influences the intake of *Porphyra purpurea*, *Undaria pinnatifida*, *Himanthalia elongata*, *Ulva rigida* and *Codium tomentosum* seaweeds in the nutritional quality of the food and various blood parameters. Since the enzymes are involved in digestive processes adapt to the diet, the effect of consuming of a green, a brown and a red seaweed in the disaccharidase enzyme activity maltase, sucrase and lactase and as well as in the enzymatic activity of leucine aminopeptidase and gamma-glutamyl transpeptidase in intestinal mucosa, liver and kidney, fundamental organs in the metabolism, are analyzed. Given that the composition of seaweed included in the diet can modulate the production of free radicals, their influence is studied, in the aforementioned organs, on lipid peroxidation and on the antioxidant enzymes activity, such as superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase, as endogenous mechanism that protects against oxidative damage.

KEYWORDS

Seaweeds, composition, nutritional value, serum parameters, antioxidants.



ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	3
1.1	NECESIDADES NUTRICIONALES	3
1.2	ALIMENTOS FUNCIONALES- NUTRACÉUTICOS-COMPLEMENTOS ALIMENTICIOS- NUEVOS ALIMENTOS	7
1.3	LAS ALGAS	9
1.3.1	<i>Tipos de algas.....</i>	<i>10</i>
1.3.2	<i>Composición de las algas.....</i>	<i>19</i>
1.3.3	<i>La explotación de las algas.....</i>	<i>23</i>
1.3.4	<i>Las algas en la alimentación</i>	<i>25</i>
1.3.5	<i>Producción de algas alimentarias.....</i>	<i>26</i>
1.4	QUÍMICA DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (EROS).....	27
1.5	EFFECTOS DE LAS EROS SOBRE MOLÉCULAS BIOLÓGICAS	32
1.5.1	<i>Peroxidación lipídica.....</i>	<i>32</i>
1.5.2	<i>Oxidación de azúcares.....</i>	<i>33</i>
1.5.3	<i>Oxidación de proteínas.....</i>	<i>36</i>
1.5.4	<i>Oxidación de ácidos nucleicos</i>	<i>37</i>
1.6	DEFENSA ANTIOXIDANTE	39
1.7	ANTIOXIDANTES Y SALUD	48
2	OBJETIVOS	55
3	MATERIAL Y MÉTODOS	59
3.1	ALGAS OBJETO DE ESTUDIO	59
3.2	DETERMINACIONES ANALÍTICAS EN LAS ALGAS.....	60
3.2.1	<i>Humedad.....</i>	<i>60</i>
3.2.2	<i>Vitaminas y minerales</i>	<i>60</i>
3.2.3	<i>Glúcidos, fibra cruda, fibra alimentaria y cenizas</i>	<i>61</i>
3.2.4	<i>Grasa</i>	<i>62</i>
3.2.5	<i>Esteroles</i>	<i>63</i>
3.2.6	<i>Proteína</i>	<i>64</i>
3.2.7	<i>Aminoácidos</i>	<i>65</i>
3.3	ANIMALES Y DIETAS DE EXPERIMENTACIÓN	69
3.4	PARÁMETROS NUTRITIVOS	72
3.4.1	<i>Determinación del valor nutritivo de las proteínas</i>	<i>74</i>
3.5	DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS HEMÁTICOS.....	79
3.6	OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE TEJIDOS	80
3.7	DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA EN TEJIDOS.....	81
3.8	DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS	81
3.8.1	<i>Disacaridasas.....</i>	<i>81</i>
3.8.2	<i>Leucino aminopeptidasa (EC 3.4.11.1)</i>	<i>86</i>

3.8.3	<i>Gamma glutamil transpeptidasa (EC 2.3.2.2)</i>	87
3.9	DETERMINACIÓN DE LAS SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO ...	91
3.10	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	94
3.10.1	<i>Superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1)</i>	95
3.10.2	<i>Glutación peroxidasa (EC 1.11.1.9)</i>	97
3.10.3	<i>Catalasa (EC 1.11.1.6)</i>	99
3.11	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	101
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	105
4.1	COMPOSICIÓN DE LAS HARINAS.....	105
4.2	VALORACIÓN DE LA CALIDAD DE LA PROTEÍNA	117
4.2.1	<i>Métodos químicos</i>	117
4.2.2	<i>Métodos biológicos</i>	126
4.3	PESO RELATIVO DE LOS ÓRGANOS	132
4.4	VALORES HEMÁTICOS.....	133
4.4.1	<i>Parámetros séricos que valoran la función cardiovascular</i>	133
4.4.2	<i>Parámetros séricos que valoran la función renal.</i>	136
4.4.3	<i>Parámetros séricos que valoran la función hepática.....</i>	138
4.4.4	<i>Niveles séricos de glucosa</i>	139
4.4.5	<i>Minerales séricos</i>	139
4.4.6	<i>Aminoácidos en sueros sanguíneos</i>	140
4.5	DETERMINACIONES NUTRICIONALES ENZIMÁTICAS	143
4.5.1	<i>Disacaridasas</i>	144
4.5.2	<i>Leucino aminopeptidasa (LAP)</i>	146
4.5.3	<i>Gamma-glutamil transpeptidasa (GGT)</i>	149
4.6	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	151
4.6.1	<i>Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i>	152
4.6.2	<i>Superóxido dismutasa (SOD)</i>	153
4.6.3	<i>Glutación peroxidasa (GPx)</i>	155
4.6.4	<i>Catalasa (CAT)</i>	158
5	CONCLUSIONES	163
6	BIBLIOGRAFÍA	169

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AAE:	Aminoácidos esenciales
AANE:	Aminoácidos no esenciales
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ALA:	Alanina
ALB:	Albúmina
AOAC:	Association of Official Agricultural Chemists
AQC:	6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinidil-carbamato
ARG:	Arginina
ARN:	Ácido ribonucleico
ASP:	Ácido aspártico
BN:	Balance nitrogenado
BUN:	Nitrógeno ureico en sangre
CAPS:	Acido <i>N</i> -clohexil-3-aminopropanesulfónico
CAT:	Catalasa
CDA:	Coeficiente de digestibilidad aparente
CDR:	Coeficiente de digestibilidad real
CIS:	Cisteína
COL:	Colesterol
DMBA:	7,12-dimethylbenz[a]anthracene
EAA:	Espectrofotometría de absorción atómica
ECP-OES:	Espectrofotometría de emisión atómica-plasma de acoplamiento inductivo
EO:	Estrés oxidativo
EROs:	Especies reactivas del oxígeno
FEN:	Fenilalanina
GGT:	Gammaglutamil transpeptidasa
GLI:	Glicina
GLU:	Ácido glutámico
Glu:	Glucosa
GOT:	Glutamato oxalacetato transaminasa
GPT:	Glutamato Piruvato transaminasa
GPx:	Glutación peroxidasa
GR:	Glutación reductasa
GSH:	Glutación reducido
GSSG:	Glutación oxidado
HDL:	Lipoproteínas de alta densidad
HIS:	Histidina
HPLC:	Cromatografía líquida de alta eficacia
HTB:	Hidroxitolueno butilado

IAA:	Índice de aminoácidos
ILE:	Isoleucina
IM:	Índice de Mitchel
INT:	2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio
IP:	Índice de proteínas
IQ:	Índice químico
IT:	Índice de transformación del alimento
LAP:	Leucinoaminopeptidasa
LDL:	Lipoproteínas de baja densidad
LEU:	Leucina
LIS:	Lisina
MDA:	Malondialdehído
MET:	Metionina
NADP ⁺ :	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NHS:	N-Hidroxisuccinimida
NO:	Óxido nítrico
NORLEU:	Norleucina
PER:	Coefficiente de eficacia proteica
PGAs:	Productos de glicación avanzada
PKC:	Proteína quinasa dependiente del calcio
PRO:	Prolina
PROT:	Proteína
R [•] :	Radical de ácido graso
RH:	Ácido poliinsaturado
ROO [•] :	Radical lipoperóxido
ROOH:	Hidroperóxido
ROOOOR:	Tretóxido
SER:	Serina
SOD:	Superóxido dismutasa
TBA:	Ácido tiobarbitúrico
TBARS:	Sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico
TCA:	Ácido tricloroacético
TIR:	Tirosina
TRE:	Treonina
UPN:	Utilización de la proteína neta
VAL:	Valina
VB:	Valor biológico
VLDL:	Lipoproteínas de muy baja densidad



INTRODUCCIÓN



1 Introducción

1.1 Necesidades nutricionales

La alimentación ocupa actualmente un lugar destacado en la atención mundial. Su implicación directa en la salud radica, no sólo en los aspectos cualitativos y cuantitativos de la ingesta, sino también en su influencia en la prevención de ciertas enfermedades (Lozano y cols. 2005).

Los alimentos deben aportar una serie de nutrientes que no son sintetizados en cantidades suficientes por el organismo. Para una buena salud, el ser humano necesita nutrientes que le proporcionen cantidades adecuadas de proteínas que incluyan todos los aminoácidos esenciales, glúcidos, ácidos grasos esenciales, vitaminas, minerales y agua (Dwyer 2012).

Los productos alimenticios pueden ejercer diversos efectos sobre la salud, que dependen de su procedencia, si son de origen animal o vegetal, de su composición, procesado, cantidad ingerida, ecosistema del que provienen, etc. Así, por ejemplo, mientras que la fibra de los alimentos resulta beneficiosa para la función gastrointestinal, un exceso puede interferir en la absorción de otros compuestos (Dwyer 2012).

Las **proteínas**, cuya función es fundamentalmente plástica, proporcionan el material nitrogenado que, en forma de aminoácidos, se necesita para la síntesis de las proteínas características de cada célula del cuerpo humano y demás sustancias nitrogenadas (Krause 1995).

La necesidad proteica de un individuo se define como la dosis más baja de proteínas ingeridas en la dieta que compensa la pérdida orgánica de nitrógeno en personas que mantienen un balance de energía a niveles moderados de actividad física (OMS-FAO 1985; OMS-FAO 2007). La ingesta de 0,60-0,75 g de proteínas/kg de peso corporal se estima como la dosis inocua para los adultos, referida a proteínas muy digestibles y que proporcionen cantidades suficientes de aminoácidos esenciales (OMS-FAO 1985; Dwyer 2012). En función de la dependencia que el organismo tenga de un determinado aminoácido, que sea imprescindible o no su incorporación exógena, puede clasificarse como esencial o no esencial. Una proteína que vaya a ser sintetizada necesita una cantidad suficiente de aminoácidos esenciales para completar dicha proteína y si falta tan solo uno de ellos, no se podrá sintetizar (Bender y Bender 1997). Los nueve aminoácidos esenciales son: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina/cisteína, fenilalanina/tirosina, treonina, triptófano y valina. La histidina aunque no se sintetice en los tejidos la puede aportar la microbiota intestinal, pudiendo ser insuficiente en requerimientos elevados o microbiota escasa. La arginina se sintetiza por el organismo pero gran parte se degrada a ornitina (ciclo de la urea), lo que en situaciones de gran demanda (crecimiento, convalecencia, etc.) puede resultar limitante. La cisteína y tirosina se forman a partir de metionina y fenilalanina, por lo que en prematuros pueden aparecer deficiencias en estos aminoácidos debido al funcionamiento inadecuado de las enzimas responsables de esta transformación. Todos los aminoácidos pueden utilizarse para generar energía y otros, como la alanina, también se pueden usar para la gluconeogénesis (Dwyer 2012).

Las proteínas no pueden ser absorbidas directamente por las células de la mucosa intestinal. Mediante enzimas apropiados del tracto intestinal se transforman en moléculas de menor peso molecular como pueden ser dipéptidos y aminoácidos, capaces de ser absorbidos por las células enterocíticas (Alpers 1994) y una vez incorporados a la sangre como aminoácidos, ésta los transporta a las diferentes células del organismo, donde son utilizados para la formación de nuevas proteínas

necesarias para el normal funcionamiento de dichas células (Santidrián 1988).

En la actualidad, para una alimentación sana se recomienda que por lo menos del 10 al 14 % de las calorías procedan de las proteínas. La calidad de las proteínas tiende a ser mayor en los alimentos de origen animal, seguidas de las legumbres, los cereales (arroz, trigo, maíz) y los tubérculos. Las combinaciones adecuadas de proteínas vegetales que se complementan o las combinaciones de proteínas animales y vegetales pueden reducir las necesidades proteínicas totales (Dwyer 2012).

Los requerimientos de proteínas son mayores durante el crecimiento, el embarazo, la lactancia y durante el tratamiento de la malnutrición.

Es importante tener en cuenta que la demanda proteica puede aumentar debido a una menor digestibilidad de las mismas. Esto se puede deber tanto a la naturaleza propia de la proteína como a otros factores dietéticos que modifiquen su digestión, como a la presencia de factores antifisiológicos (fibra, fitatos y polifenoles alimentarios incluidos los taninos) o a las condiciones de elaboración que pueden interferir en los procesos enzimáticos de liberación de los aminoácidos (OMS-FAO 1985; Church y cols. 2002).

Por lo tanto, la calidad de una proteína variará dependiendo de su composición en aminoácidos y de su biodisponibilidad (cantidad de nutriente del alimento que en el organismo se puede utilizar), que a su vez depende de la digestibilidad (cantidad de nutriente ingerido que se transforma por el proceso digestivo en una forma que el organismo pueda absorber) y su absorbabilidad (cantidad de nutriente absorbido que puede ser utilizado por el organismo para realizar una función biológica) (Hernández y cols. 1996).

La calidad de una proteína vendrá condicionada por la cantidad de aminoácidos esenciales presentes, a mayor cantidad y equilibrio, tendremos una proteína equilibrada o de mayor calidad. La mayoría de

las proteínas de origen vegetal son deficitarias en uno o varios aminoácidos esenciales.

Las **grasas** constituyen una fuente concentrada de energía. Para una salud adecuada la energía que aportan las grasas en la alimentación no debería superar el 30 % del total. Para alcanzar los objetivos nutricionales idóneos en cuanto al consumo de los diferentes tipos de grasas se recomiendan un porcentaje no superior al 7-8 % de ácidos grasos saturados (no presentan dobles enlaces en la cadena hidrocarbonada), un 15-20 % de monoinsaturados (presenta un doble enlace) y alrededor de un 5 % de poliinsaturados (con 2 ó más dobles enlaces). Dentro de estos últimos cabe reseñar la importancia de mantener una relación entre los ácidos grasos ω -6 y ω -3 de alrededor de 5:1 para conseguir un equilibrio fisiológico armónico (Urrialde de Andrés 2003). En España existe un déficit de consumo de ω -3 con respecto a los ácidos grasos ω -6 (Mataix 2004).

Tanto la cantidad como el tipo de grasa consumidos tienen efectos en la concentración de colesterol en sangre y su composición lipoproteica, así como en la oxidación lipídica, la presión arterial, la coagulación y sobre los componentes celulares que intervienen en el desarrollo de la lesión aterosclerótica (Connor y cols. 1986; Iso y cols. 2006; Sanjurjo 2007).

Los **glúcidos** se clasifican desde el punto de vista nutritivo por su índice glucémico, que indica de qué manera la ingesta de ese alimento aumenta la glucemia comparado con un patrón, que suele ser la glucosa o el pan blanco, al que se le asigna un valor de 100 (Jenkins y cols. 1981). De esta forma, aquellos alimentos que tienen un alto índice glucémico, ricos en oligosacáridos y/o féculas de alta biodisponibilidad y pobres en fibra dietética, tienen una digestión y absorción rápidas, alcanzando la glucosa el torrente sanguíneo en poco tiempo, lo que produce elevados picos de glucemia e incrementa las necesidades de insulina. Por el contrario, los alimentos con glúcidos de bajo índice glucémico tienen un elevado contenido en almidón resistente y fibra dietética (principalmente los cereales integrales y derivados, las hortalizas y las legumbres), que hace que la absorción de

la glucosa se haga de forma paulatina. Los glúcidos no disponibles (fibra dietética soluble) son resistentes a la acción enzimática y su absorción se produce tras ser transformados por la microbiota del colon en ácidos grasos de cadena corta, por lo que no generan glucosa (Ruiz-Roso 2013). Se recomienda que los glúcidos constituyan entre el 55 y el 60 % del total de la ingesta energética, de los cuales aquellos con un índice glucémico alto no deberían superar el 10 % (OMS-FAO 2003). Se considera que un consumo de 25-35 g/día de fibra dietética (10-13 g al día/1.000 kcal), procedente de diferentes fuentes de alimentos y con una proporción adecuada entre fibra soluble e insoluble (1:3), es la cantidad necesaria para una función intestinal normal en adultos y así aprovechar su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer de colon y diabetes (Zarzuelo y Gálvez 2010; Ruiz-Roso 2013).

Según Ruiz-Roso (2013), en España el consumo de glúcidos y en especial de fibra dietética, está por debajo de los valores recomendados; habría que incrementar su inclusión en la dieta, en especial la fracción insoluble ya que es la parte más deficitaria de la fibra en la alimentación española. El consumo de cereales integrales o leguminosas aumenta la ingesta de fibra insoluble y de los elementos bioactivos asociados a ella, a la vez que se reduce el aporte energético lo que puede ayudar a controlar mejor el peso.

1.2 Alimentos funcionales- Nutracéuticos-Complementos alimenticios-Nuevos alimentos

Un **alimento funcional** es un alimento convencional que aporta al organismo cantidades de vitaminas, grasas, proteínas, glúcidos y otros elementos necesarios para el organismo y que se consume dentro de una dieta normal pero que además de sus propiedades nutritivas

básicas presenta cualidades beneficiosas para la salud y/o reduce el riesgo de contraer enfermedades crónicas. El International Life Science Institute (ILSI) estableció que un “alimento funcional es aquel que contiene un componente, nutriente o no nutriente, con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, añadido a su valor nutricional y cuyos efectos positivos justifican que pueda reivindicarse su carácter funcional o incluso saludable”. Los alimentos funcionales pueden presentarse como alimentos enriquecidos beneficiosos para la salud, como zumos, lácteos o aceites con vitaminas, minerales, fitoesteroles, etc.

Según el ILSI, un alimento funcional puede ser:

- Un alimento natural no modificado.
- Un alimento en el que se ha incrementado uno de los componentes gracias a condiciones especiales de cultivo, de crianza o procedimientos biotecnológicos.
- Un alimento al que se ha añadido un componente para proporcionar beneficios.
- Un alimento al que se ha eliminado un componente por procedimientos tecnológicos o biotecnológicos, de forma que adquiere propiedades beneficiosas.
- Un alimento en el que se sustituye un componente por otro con propiedades más favorables.
- Un alimento en el que uno o más componentes han sido modificados por métodos químicos, enzimáticos o tecnológicos para proporcionar un beneficio.
- Un alimento en el cual la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes ha sido modificada.
- Cualquier combinación de las anteriores posibilidades.

Según la Sociedad Española de Nutracéutica un **producto nutracéutico** es un compuesto de origen natural con propiedades biológicas activas, beneficiosas para la salud y con capacidad preventiva y/o terapéutica definida y que mejoran la calidad de vida. Además requiere un análisis químico de estabilidad y toxicología, con estudios reproducibles de sus propiedades bioactivas en animales de experimentación y un proceso de desarrollo y validación siguiendo

criterios científicos equiparables a cualquier otro medicamento (criterios de la Food and Drug Administration). En definitiva los nutraceuticos serían los medicamentos de origen natural.

Las plantas medicinales y fitoterápicas no se consideran alimentos por sí mismos, ni complementan la dieta. Se utilizan con fines preventivos y terapéuticos, extrayendo los principios activos con métodos como cocción, infusión, etc.

Otras categorías de alimentos o ingredientes alimentarios serían los **complementos alimenticios** que se incluirían como suplemento en la ingesta de una dieta normal, o los **alimentos dietéticos** que debido a su composición especial o proceso de manufacturación son adecuados para procesos nutricionales de personas con una condición fisiológica especial. Por último, los **nuevos alimentos** son alimentos o ingredientes alimentarios que, hasta el momento, no han sido utilizados o lo han hecho sólo de forma anecdótica (Nova y cols. 2010).

1.3 Las algas

Las algas son vegetales acuáticos con una gran diversidad que, al igual que los vegetales terrestres, presentan múltiples formas y tamaños. Las hay extremófilas que se desarrollan en ambientes con condiciones adversas, con los únicos condicionantes de la presencia de humedad e iluminación, incluso las hay que se han adaptado a una emersión más o menos prolongada. Ya sean uni o pluricelulares, las algas se alimentan directamente a través de su superficie y toman los elementos nutritivos del medio que las baña o las humedece (Cabioc'h y cols. 2007).

Dentro de las algas podemos distinguir organismos procariotas (Cianofíceas), caracterizados por no presentar el núcleo separado del resto de la célula mediante una membrana y en las que los pigmentos

fotosintéticos están dispersos en el contenido celular y, organismos eucariotas, con el núcleo separado del resto de la célula mediante una membrana y en la que los pigmentos fotosintéticos están contenidos en los plastos.

Las algas planctónicas (en su mayoría unicelulares móviles o que flotan libremente) constituyen una parte esencial de la cadena alimentaria de todos los seres acuáticos, mientras que las algas bentónicas, en su mayoría macroscópicas, suelen fijarse a una superficie firme mediante un aparato vegetativo compuesto por un disco o rizoma del que sale un “talo” (Talófitas, carecen de verdaderas raíces, tallos y hojas).

Las algas marinas crecen en abundancia en las zonas intermareal y submareal, a una profundidad de hasta unos 200 m, según la penetración de la luz solar (Bárbara y Cremades 1987).

1.3.1 ***Tipos de algas***

La clasificación en grupos se realiza atendiendo a caracteres taxonómicos como: morfología y reproducción, pigmentos fotosintéticos, productos de reserva, composición de la pared celular, flagelos de las células móviles, estructura del núcleo, cloroplasto, pirenoide (zona del cloroplasto que participa en la formación de almidón) y mancha ocular (orgánulo constituido por una gran concentración de lípidos). Así se pueden distinguir fundamentalmente cuatro grandes grupos:

1.3.1.1 **Cianófitos (Cyanophyta; algas azules)**

Es el grupo que presenta menor número de especies. Son microscópicos procariotas con pigmentos verde-azulados, carecen de almidón y no poseen células flageladas. Entre las que tienen uso biotecnológico destaca la *Spirulina* con un alto contenido proteico.

1.3.1.2 Rodófitos (Rhodophita; algas rojas)

Algas uni o pluricelulares, en su mayoría macroscópicas que viven fijadas a las rocas u otros sustratos y que por su especial composición en pigmentos son capaces de ocupar ambientes poco iluminados. Su color rojizo se debe a la existencia de biliproteínas (ficoeritrina y ficocianina principalmente) que enmascaran el color verde de la clorofila. Los ficocoloides (agar y carragenatos) son los principales productos de interés industrial en estas algas. Las especies más explotadas de este grupo son: *Gelidium sesquipedale* y *Gracilaria* spp (obtención de agar-agar); *Kappaphycus alvarezii* (Cottonii), *Eucheuma denticulatum* (Spinosum), *Gigartina* spp y *Chondrus* spp, que se utilizan para la obtención industrial de carragenatos; *Porphyra* spp (Nori), *Palmaria palmata* (Dulse) y *Chondrus crispus* (Musgo de Irlanda) que se emplean en la elaboración de productos destinados a la alimentación.

Porphyra purpurea (Roth) Agardth, que pertenece a la familia de algas rojas *Bangiaceae*, conocida en Galicia como “Touca” y en todo el mundo como **Nori**, es un alga que forma láminas de hasta 30 cm de diámetro, de color violáceo y su fijación al sustrato es mediante un disco basal (Cabioc'h y cols. 2007; Castiñeira 2011). Es el producto alimentario más importante en la cultura oriental, con el que se realiza el plato típico “sushi maki” (Figura 1.1).

El cultivo industrial tradicional de Nori se realiza principalmente en Japón, Corea y China. En el año 2008 se extrajeron 1,4 millones de toneladas, lo que la sitúa como tercera alga alimentaria mundial, pero debido a su alto valor económico (6 veces más que Kombu y el doble que Wakame), hizo que Japón fuese el segundo mayor productor de algas del mundo en cuanto a dicho valor (FAO 2004; FAO. Departamento de Pesca y Acuicultura 2010). En los años 2009 y 2011 se recolectaron en Galicia 0,7 y 2,5 toneladas respectivamente, para volver a descender a 0,6 toneladas en el año 2013 (Tabla 1.1)



Figura 1.1.- Alga Nori

Tabla 1.1.- Algas recogidas en Galicia (Toneladas)

	Año		
	2009*	2011**	2013***
Wakame	14,0	47,4	93,7
Nori	0,7	2,5	0,6
Lechuga de mar	6,9	12,8	5,7
Espagueti de mar	86,3	25,1	31,8
Ramallo de mar	-	0,7	2,2

* García Tasende (2011).

** García Tasende (2012). Foro dos Recursos Algales de Galicia. Tecnopixe-Plataforma Tecnolóxica CETMAR, Vigo.

*** García Tasende y Peteiro (2015)

El alga Nori suele venderse en hojas dobladas y prensadas de 20 cm, presentando un aspecto de hojas de papel oscuro o morado, cortadas en rectángulos. Se consume en platos orientales muy populares como el sushi, tostadas sobre el fuego y desmenuzadas sobre ensaladas, platos de arroz, pastas o sopas. En las costas de País de Gales preparan un plato tradicional a base de esta alga, el “laverbread”. Es apreciada por sus propiedades nutritivas, especialmente en proteínas, minerales y vitaminas (Ferreiro y cols. 1993; Cremades y cols. 1998), lo que hace que sea un excelente complemento en la alimentación (MacArtain y cols. 2007).

1.3.1.3 Cromófitos (Pyrrophyta, Chrysophyta y Phaeophyta; algas pardo-doradas)

Son algas pluricelulares en su mayoría macroscópicas, aunque incluyen menos especies que las rojas son más aparentes debido al mayor tamaño de muchas de ellas. La coloración parda se debe a que contienen ciertos pigmentos carotenoides llamados fucoxantinas. La presencia de alginato en este tipo de algas (en mayor medida en las que crecen en aguas frías) propicia su explotación comercial. Las principales especies que se utilizan para este fin son: *Ascophyllum* spp y *Laminaria* spp (en Europa y Asia), *Lessonia* spp (América del Sur), *Ecklonia* spp (Sudáfrica), *Durvillaea* spp (Australia y Chile) y *Macrocystis* spp (California y Baja California) mientras que las más utilizadas en la alimentación son: *Laminaria* spp (Kombu), *Undaria pinnatifida* (Wakame), *Hizikia fusiforme* (Hiziki), *Eisenia bicdyclis* (Arame), *Saccharina latissima* (Kombu de azúcar) e *Himanthalia elongata* (Espagueti de mar).

Undaria pinnatifida (Harvey) Suringar, pertenece a la Familia *Alariaceae* que habitualmente se conoce por su nombre asiático, **Wakame**, aunque en Galicia también se puede escuchar “Golfo” o “Carballa” para referirse a esta alga (Figura 1.2). Tiene un talo que puede alcanzar 1,5 m de largo y se fija al sustrato mediante un rizoide del que parte un estipe aplanado y lobulado que se ensancha dando lugar a una gran lámina de aspecto pinnado. Es una especie anual que

se encuentra en sustratos rocosos a nivel infralitoral de costas expuestas y semiexpuestas. (Cabioc'h y cols. 2007; Castiñeira 2011).

Wakame

- *Undaria pinnatifida*
- Otros nombres:
 - Golfo
 - Carballa
- Cultivo
- Invasora



Figura 1.2.- Alga Wakame

Con un origen oriental conquistó mares como el Mediterráneo o Atlántico de manera accidental. En Galicia está presente desde el año 1988 (Santiago Caamaño y cols. 1990) introducida, de forma muy probable, con la importación de ostras desde Francia. Se puede encontrar adherida a las bateas hasta una profundidad de 10 m y debido a sus características de fácil cultivo fue una de las primeras macroalgas utilizadas para experiencias de cultivo en nuestras costas (Ferreiro y cols. 1993; Pérez-Cirera y cols. 1996).

A nivel mundial Wakame es la segunda alga alimentaria de mayor producción. En el año 2012 se recolectaron más de 2 millones de toneladas procedentes sobre todo de la República de Corea, Japón y China (FAO 2014). Según datos presentados en el “Foro dos Recursos

Algales de Galicia (Tecnopeixe-Plataforma Tecnológica CETMAR)” en Galicia en los años 2009 y 2011 se extrajeron 14 y 47,4 toneladas de dicha alga respectivamente, hasta llegar a 93,7 toneladas en el 2013 (Tabla 1.1). Como alga autóctona se permite e incluso se recomienda la extracción de Wakame en el Parque Nacional Marítimo Terrestre das Illas Atlánticas de Galicia.

Una vez recogida se seca directamente o con un previo escaldado adquiriendo un color verde oscuro o verde brillante. En fresco es de suave y peculiar aroma, su sabor puede recordar al de la ostra. Se utiliza de diferentes formas, tanto cruda en ensaladas como cocinada en sopas o acompañando a carnes o pescados, lo que hace que sea ideal para iniciarse en el consumo de algas. Por su riqueza en ácido glutámico potencia mucho el sabor de los alimentos a los que acompaña. Se puede usar como otras algas para ablandar y acelerar la cocción de las legumbres secas. En polvo se emplea como condimento en arroces o guarniciones. Puede ser útil como apoyo nutricional sobre todo en dietas en la que se quiere aumentar el consumo de minerales y vitaminas (Burtin 2003; Kolb y cols. 2004).

Espagueti de mar, *Himanthalia elongata* (Linneo) S.F.Gray, conocida en Galicia como “Cinta” o “Correa” (Figura 1.3) es un alga parda perteneciente a la familia *Himanthaliaceae*, de color oliváceo y consistencia coriácea, conocida como “Espagueti de mar” o “Judía de mar” por su característica forma de cinta con ramificación dicotómica que parte de un disco basal con el que se sujeta a las rocas del mesolitoral inferior e infralitoral de costas expuestas o semiexpuestas (González y cols. 1998; Castiñeira 2011). En el año 2009 se recolectaron en Galicia 86,3 toneladas lo que la situó en el primer lugar de las algas alimentarias, pero en 2011 y 2013 con 25,1 y 31,8 toneladas respectivamente, descendió al tercer lugar por detrás de *Laminaria* spp y *Undaria pinnatifida* (Tabla 1.1). Suele ser localmente muy abundante, llegando a formar grandes extensiones que cubren a otras algas en marea baja y forma bosques de algas cuando la marea está alta. Con la llegada de los temporales de otoño las correas se desprenden y aparecen grandes cantidades arrojadas a las playas.

Espagueti de mar

- *Himanthalia elongata*
- Otros nombres:
 - Judía de mar
 - Correa
 - Cinta



Figura 1.3.- Alga Espagueti de mar

Aunque es una especie rica en alginatos no se extraen para su obtención de forma industrial, pero sí se utiliza para abonar cultivos como el de la alcachofa. Desde el punto de vista alimentario se comercializa de forma individual o junto a otros productos marinos como pueden ser erizo de mar o navajas (Cremades y cols. 1998).

1.3.1.4 Clorófitos (Euglenophyta, Charophyta y Chlorophyta; algas verdes).

Es un grupo muy heterogéneo de algas uni o pluricelulares en su mayoría macroscópicas con menor número de especies que las pardas, que usan como pigmentos fotosintéticos preponderantes las clorofilas y presentan verdadero almidón dentro de los plastos. La utilización de algas verdes en la industria no está muy extendida, pero sí su empleo en la alimentación humana. Las especies más representativas son la

Lechuga de mar (*Ulva* spp) y el Ramallo de mar (*Codium* spp) (Bárbara y Cremades 1987; Cabioc'h y cols. 2007; Castiñeira 2011).

Lechuga de mar, *Ulva rigida* C. Agardh (Figura 1.4), pertenece a las algas verdes de la familia *Ulvaceae* y su nombre vulgar se debe a su color y forma característica. Es un alga laminar de hasta 20 cm de longitud, que se estrecha en la base formando un pequeño disco por el que se sujeta a rocas o epífita sobre otras algas (González y cols. 1998). A nivel mundial se recogen alrededor de 100.000 toneladas de algas verdes, en su mayoría pertenecientes a los géneros *Monostroma*, *Enteromorpha* y *Ulva* (Rajadurai 1990; Barsanti y Gualtieri 2014).



Figura 1.4.- Alga Lechuga de mar

En el año 2009, 2011 y 2013 se extrajeron en Galicia 6,9; 12,8 y 5,7 toneladas respectivamente de Lechuga de mar (Tabla 1.1). Se puede ver en la zona litoral e infralitoral de todo tipo de costas, tanto protegidas como expuestas, con mayor presencia en las primeras. Se emplea tanto en alimentación humana como animal, también es muy utilizada en experimentos de biorremediación, como producción de

biomasa y energía y además posee cualidades como bioindicador de contaminación (O'Shanahan y Vela 2003; Hasan y Chakrabarti 2009; Nielsen y cols. 2012).

Ramallo de mar, *Codium tomentosum* (Hudson) Stackhouse, familia *Codiaceae*, también conocida como Fideo de mar y en Galicia como “Carrasca brava” (Figura 1.5), es un alga verde oscura de hasta 30 cm, con talo de consistencia esponjosa, cilíndrico, tacto suave (con mucha vellosidad en su superficie) y con ramificación dicotómica. Especie perenne que se fija mediante un disco basal sobre rocas en el nivel mesolitoral medio e inferior de costas expuestas o protegidas (González y cols. 1998; Castiñeira 2011). De ella, en 2011 y 2013 se recogieron en nuestras costas 0,7 y 2,2 toneladas respectivamente (Tabla 1.1).



Figura 1.5.- Alga Ramallo de mar

En países como Japón se consume directamente en fresco o cocida formando parte de sopas o guarnición. Es un alga que la

industria ha utilizado como antihelmíntico y para obtención de productos farmacéuticos como pueden ser las lectinas (Bárbara y Cremades 1987; Cremades y cols. 1998).

1.3.2 *Composición de las algas*

Una de las características principales de las “verduras del mar” son sus considerables cantidades de **minerales**: potasio, cloro, sodio, calcio, magnesio, azufre, fósforo, yodo, hierro, cobre y manganeso, y oligoelementos como flúor, litio, selenio, cobalto y zinc. Por esta razón pueden ser usadas para suplementar la dieta y así alcanzar más fácilmente la cantidad diaria recomendada de muchos de ellos (González y cols. 1998).

Su alto contenido en **vitaminas** E, A, C y vitaminas del complejo B, imprescindibles para el metabolismo, entre las que destacan la Vit. B₃ (niacina) y Vit. B₆ (piridoxina) junto con la Vit. B₁₂ (cianocobalamina), escasa en vegetales terrestres, hace que el consumo de algas, posiblemente sea importante en aquellos individuos que utilizan dietas vegetarianas (Watanabe 2007).

La composición en **glúcidos** varía según los diferentes grupos de algas, pero en ellos se pueden encontrar ácido algínico, fucosanos, carragenatos, laminarina, manitol y celulosa. La digestibilidad de todos ellos es variable, aunque todos entrarían dentro de la categoría de fibra alimentaria (González y cols. 1998). Este alto porcentaje de fibra podría conllevar efectos beneficiosos al contrarrestar muchas “enfermedades de la opulencia” propias del mundo occidental, como pueden ser: enfermedades del tracto digestivo, obesidad, enfermedades cardiovasculares o diabetes, así como, también podrían implementar la actividad anticancerígena, antioxidante, antihipertensiva y una mejora de la microbiota y el tránsito intestinal (Jiménez-Escrig y Goñi 1999; Zarzuelo y Gálvez 2010; Kumar y cols. 2015).

El hábitat y especialmente la época del año influyen en las características de las **proteínas, péptidos y aminoácidos** en las algas.

La proteína varía con las distintas especies dependiendo del tipo de alga, estado reproductivo y zona de recogida, pero en general las algas pardas suelen tener menor cantidad de proteína, que oscila entre 3-24 % mientras que está entre 4-30 % en algas verdes y entre 5-44 % en las rojas (Marsham y cols. 2007; Holdt y Kraan 2011).

La mayoría de las algas contienen todos los aminoácidos esenciales y son una buena fuente de los ácidos aspártico y glutámico, sobre todo las pardas (Fleurence y Yada 2004). Aunque aminoácidos como lisina, treonina, triptófano, cisteína, metionina e histidina se indican como aminoácidos limitantes en las algas, contienen cantidades superiores a las encontradas en muchos vegetales terrestres y similares o incluso mayores que los considerados vegetales proteicos como la soja (Galland-Irmouli y cols. 1999; Bocanegra y cols. 2009).

Las características organolépticas de las algas se deben principalmente a su composición en aminoácidos. Las cantidades relativas de glicina, alanina, ácido aspártico y sobre todo ácido glutámico le confieren su particular sabor (“umami”, del japonés sabor agradable) (Nisizawa y cols. 1987).

Numerosas macroalgas poseen lectinas, proteínas o glucoproteínas naturales de origen no inmune que son capaces de reconocer y unirse de manera reversible a glúcidos. Experimentos realizados con lectinas de *Ulva sp.*, *Gracilariaria sp.*, *Codium fragile* o *Euchema amakusaensis* muestran que estos componentes poseen propiedades bioactivas como antibióticos, mitogénicas, citotóxicas, anticonceptivas, antiinflamatorias, anti-adhesión y anti-VIH (Holdt y Kraan 2011). Otros derivados aminoacídicos como dipéptidos, oligopéptidos y péptidos presentes en algunas algas, tienen cualidades anticancerígenas, hipoglucemiantes, hipocolesterolemiantes, reductoras de la presión sanguínea, mitogénicas y antioxidantes (Holdt y Kraan 2011).

La taurina es un derivado de la cisteína, se considera un aminoácido aunque carece de carboxilo que es sustituido por un grupo sulfonato. Las algas rojas en comparación con las algas pardas

contienen concentraciones apreciables de este aminoácido (Dawczynski y cols. 2007). Así, por ejemplo, los niveles encontrados en *S. latissima* y *P. tenera* son similares a los de mariscos y calamares (Murata y Nakazoe 2001). Este aminoácido es importante en la formación de la bilis y en el control del colesterol, además se le atribuyen otras propiedades promotoras de la salud como antihipertensivo y antioxidante (Lourenço y Camilo 2002; Schultz 2014). Otros aminoácidos de interés como la laminina, con actividad hipotensiva y los ácidos cálnico y domoico con actividad insecticida, antihelmíntica, bactericida y neuroexcitadora se encuentran en macroalgas marinas (Parsons 1996; Bhakuni y Rawat 2005). Además, estos dos últimos aminoácidos se han utilizado en investigaciones relacionadas con el Alzheimer, Parkinson y epilepsia (Smit 2004).

La biodisponibilidad de los aminoácidos procedentes de la digestión proteica de las algas se puede ver disminuida por la presencia de determinados agentes antinutricionales. Así, Fleurence (1999), mediante estudios *in vitro* observa que la actividad de diferentes proteasas varía según el alga, la zona de recogida y los componentes antinutricionales que contengan, como pueden ser fenoles, polisacáridos o glucoproteínas.

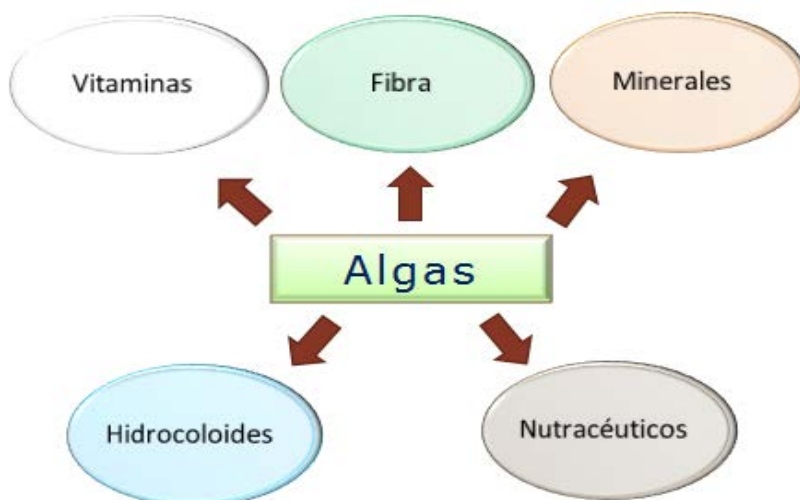
La cantidad de **grasa** normalmente se sitúa entre el 1,5 %-4 % de materia seca (Mabeau y Fleurence 1993; Jiménez-Escrig y Goñi 1999), por lo que, en términos generales, la aportación de energía de los lípidos que provienen de las algas es ínfima. La composición de ácidos grasos en cada especie también varía con la época del año, las condiciones ambientales y el desarrollo de las algas (Bocanegra y cols. 2009), e incluyen monoinsaturados y poliinsaturados que son el contrapunto a sus ácidos grasos saturados (Colombo y cols. 2006; Dawczynski y cols. 2007; van Ginneken y cols. 2011), esto hace que exista un equilibrio entre los distintos ácidos grasos a la hora de incorporarlos a la dieta (Simopoulos 2008).

El aporte calórico bajo de las algas debido a la grasa contenida y su buena calidad ya que entre el 20 y el 50 % de la grasa total corresponde a omega-3, contribuye a un mayor equilibrio lipídico al

reducir la relación habitual de la ingesta de ω -6/ ω -3 (Bocanegra y cols. 2009; Wilke y cols. 2015).

Los **polifenoles** de las algas son derivados del floroglucinol (1,3,5-trihydroxybenceno) con una gran variedad de grupos y moléculas, que les confiere una potencial amplia gama de actividades biológicas (Burtin 2003). Las algas verdes y rojas tienen un bajo contenido de polifenoles con respecto a las pardas, las cuales pueden llegar a tener un 14 % en sustancia seca. Además, su concentración puede variar de forma notable según el período reproductivo, época del año, localización y salinidad, así como el tiempo de emersión (Holdt y Kraan 2011). Los polifenoles se han considerado tradicionalmente como poco bioasimilables, pero algunos estudios indican un incremento en la capacidad antioxidante del plasma después de su ingestión formando parte de alimentos o bebidas (Kalt y cols. 2000). Por otra parte, estudios epidemiológicos encuentran una asociación entre el elevado consumo de polifenoles en la dieta y la baja incidencia de enfermedades crónicas (Arts y cols. 2001; Holdt y Kraan 2011).

COMPONENTES MÁS DESTACADOS DE LAS ALGAS



1.3.3 ***La explotación de las algas***

Los habitantes de las costas han aprovechado las algas marinas tanto como fertilizante del suelo en la agricultura como para fines alimenticios. Gracias a su elevado contenido en fibra y minerales acondicionan el suelo para mejorar sus propiedades, pero hoy en día con la llegada de los fertilizantes químicos sintéticos, mucho más baratos, esta práctica queda relegada a la agricultura ecológica. También se usan las algas en la alimentación animal, bien directamente o, después de un secado y molienda, como aditivo formando parte de piensos (González y cols. 1998).

Las técnicas empleadas en la recolección varían desde las más rudimentarias, como el arranque manual o con pequeños utensilios (rastrillos, hoces, etc.) hasta niveles de mecanización de cierta complejidad, como dragas provistas de cuchillas o brazos articulados sumergidos que cortan y remontan las algas hasta la embarcación (Llera y Álvarez 2007).

En los países del Extremo Oriente el consumo de algas forma parte de su tradición culinaria y su recolección del medio natural se ha mantenido de manera habitual a lo largo de la historia. Pero es con el desarrollo de las industrias de los extractos de algas, fundamentalmente hidrocoloides (agar, alginato y carragenina), cuando aumenta el cultivo y explotación de las algas marinas con planteamientos industriales y la abundancia de una determinada especie así como, su valor como recurso, rentabiliza el proceso de su recolección (FAO 2004). Los ficocoloides se utilizan como gelificantes, espesantes y estabilizantes en la industria agroalimentaria, cosmética (pueden mejorar la retención de la humedad de la piel) y farmacéutica. Algunos ejemplos de estos productos podrían ser comidas para bebés, alimentos para animales, cremas, recubrimiento de embutidos e incluso jabones o dentífricos, así como aditivos alimentarios que van desde el E-400 al E-407 (McLachlan 1985). Una parte importante de la producción mundial de agar se extrae de algas procedentes de España (Cremades y cols. 1998; García Tasende 2011).

De manera tradicional, algunas algas eran recolectadas por sus propiedades terapéuticas y utilizadas como remedios caseros contra ciertas dolencias. Hoy en día se está probando su utilidad en proyectos tan dispares como la producción de combustibles, tratamiento de aguas residuales o como agentes antivirales (McHugh 2002; FAO 2004; Kim y cols. 2015).

Se conocen alrededor de 25.000 especies de algas, menos del 20 % constituyen el 90 % de la biomasa que se utiliza en diversos campos. En Galicia están presentes más de 60 especies con valor comercial. Entre los géneros de mayor interés están las algas pardas *Laminaria*, *Undaria*, *Ascophillum*, *Himantalia* y *Fucus*; las rojas, *Gelidium*, *Matocarpus*, *Chondrus*, *Porphyra* y *Gigartina*, y entre las verdes, *Ulva*, *Enteromorpha* y *Codium* (González y cols. 1998).

APLICACIONES DE LAS ALGAS



1.3.4 *Las algas en la alimentación*

La gran variedad de formas, texturas, propiedades nutricionales y fácil producción natural hacen de las algas marinas candidatos ideales para su incorporación a la dieta. Cada pueblo tiene sus propias recetas pero tradicionalmente se preparan de tres maneras: lavadas y comidas crudas, cocinadas como cualquier vegetal o hervidas y azucaradas para hacer gelatinas. En la alimentación humana se utilizan unas 200 especies, de las cuales en Japón, China y Corea se usan unas 50, siendo las más consumidas Kombu (*Laminaria spp.*), Wakame (*Undaria spp.*) y Nori (*Phorphyra spp.*) (Menéndez y Fernández 2005).

En los países occidentales, el consumo de algas en la dieta tradicional no es tan habitual, incluso en zonas costeras con una gran producción natural. En Europa, se elaboran algunos platos a base de algas en poblaciones de Gran Bretaña, Irlanda o Alemania. Las algas tradicionalmente consumidas en Europa pertenecen a tres géneros: “Laver” (*Porphyra spp.*), “Dulse” (*Palmaria palmata*) y el “Musgo de Irlanda” (*Condrus crispus*).

En el caso de Galicia, una de las áreas más rica y diversa en algas marinas de Europa, no existe esta tradición culinaria quizás debido a la gran variedad de vegetales terrestres presentes en nuestro territorio (Muíños 2009); sin embargo, su consumo está experimentando un aumento considerable en la llamada nueva cocina o cocina de autor, sin duda debido al peculiar sabor y textura de los diferentes tipos de algas (Mouritsen y cols. 2012; Kawasaki y Shimomura 2015).

En los últimos años, los restauradores no solo intentan enseñarnos nuevos alimentos y diferentes formas de elaborarlos, combinarlos y presentarlos, sino que además, saben de su influencia en la salud y su relación con determinadas enfermedades. Las verduras del mar forman parte de esta filosofía, son un ingrediente común en la nueva cocina y en las dietas que conllevan hábitos alimentarios saludables (Muíños 2009).

1.3.5 ***Producción de algas alimentarias***

Hoy en día más del 90 % de la producción mundial de algas procede de la acuicultura. El mayor productor mundial de algas alimentarias es China, seguido a cierta distancia de República de Corea y Japón. Corresponde a Kombu (*Laminaria japonica*) la mayor producción con 5,5 millones de toneladas en peso fresco, cultivada en su mayoría en China, en cuerdas suspendidas ocupan cientos de hectáreas en el océano (McHugh 2002, FAO 2014). En Galicia, en el año 2013, se recogieron 713,2 toneladas de algas, de las que el 35,3 % se destinaron a alimentación (García Tasende y Peteiro 2015).

El cultivo de algas puede realizarse de forma extensiva, cultivo en el mar, con especies con propagación vegetativa en las que se realiza una fragmentación y una resiembra de los fragmentos; un cultivo mixto mar-planta de procesado, en el que la obtención de la semilla y el sembrado se realiza en el laboratorio en condiciones controladas; y una tercera opción, en la que el cultivo se hace exclusivamente en tierra adentro, con sistemas altamente mecanizados y con mano de obra cualificada (Cremades 1997). En España existen diferentes empresas que se dedican a la extracción y comercialización de algas tanto procedentes de la recolección del medio natural como de cultivos de especies con un cierto valor comercial.

En los últimos tiempos se están llevando a cabo experimentos en los que se integra el cultivo de algas con el de distintos tipos de animales como pueden ser peces, moluscos, equinodermos o crustáceos, en lo que se denomina acuicultura multitrófica integrada (AMTI) (Figura 1.6). Este procedimiento llevaría a un sistema equilibrado de producción acuícola, con un mejor aprovechamiento de los diferentes niveles tróficos, lo que redundaría en una mayor calidad de las aguas, tanto en el medio marino como en los sistemas de producción de circuito abierto o cerrado (García 2012).

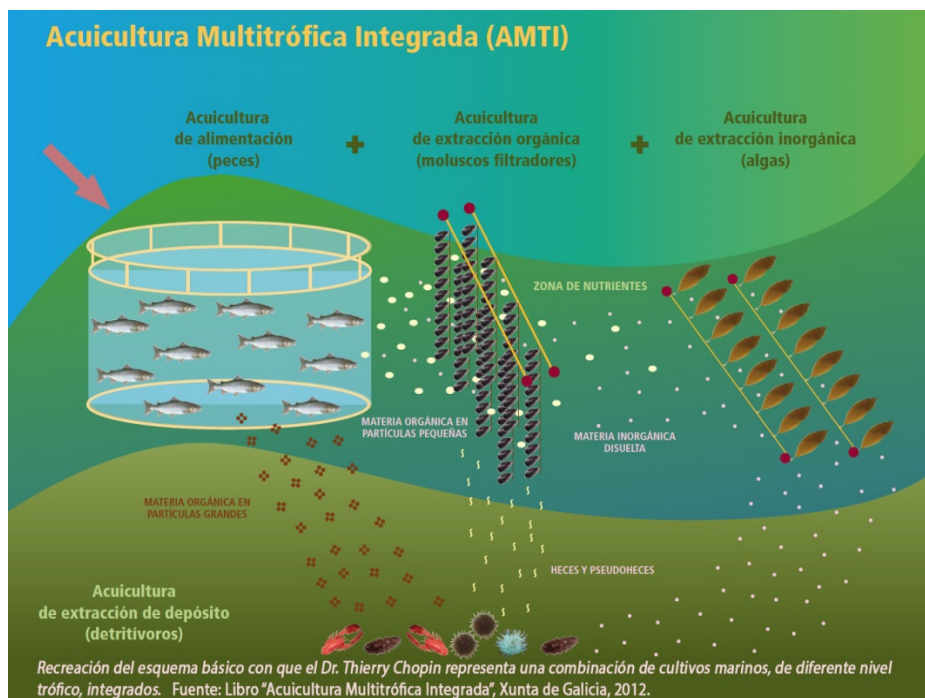


Figura 1.6.- Algas en la acuicultura multitrófica integrada

1.4 Química de las especies reactivas del oxígeno (EROs)

En un principio Lavoisier consideró la oxidación como el proceso por el cual el oxígeno es agregado a una sustancia, siendo la reducción el fenómeno opuesto. Posteriormente Wieland denominó oxidación a la pérdida de hidrógeno, o lo que es lo mismo una deshidrogenación. Hoy en día, la oxidación equivale a la pérdida de electrones y la reducción al proceso opuesto, ganancia de electrones. O dicho de otro modo, un compuesto en proceso de reducción implica un descenso del número de oxidación (valencia) y, por el contrario, un aumento de dicho número implica una oxidación (Figura 1.7).

La intensidad de la oxidación está íntimamente ligada a muchos factores: presión de oxígeno, superficie expuesta, temperatura, pH, presencia de enzimas oxidantes, a_w (actividad de agua), presencia de sustancias prooxidantes o antioxidantes, etc. Los sustratos más sensibles a la oxidación son los ácidos grasos insaturados, debido a sus enlaces C=C con alta intensidad electrónica.

El oxígeno es esencial para la vida de los organismos aerobios, y su mayor parte (98 % o más) se utiliza para la generación intracelular de energía, la cual se libera durante las oxidaciones biológicas y se almacena en las células en forma de ATP. Actúa como aceptor final de electrones liberados durante la oxidación de nutrientes, al adquirir un total de cuatro electrones por molécula con producción de dos moléculas de agua. Esta reacción está catalizada por la enzima citocromo C oxidasa, localizada al término de la cadena respiratoria mitocondrial.

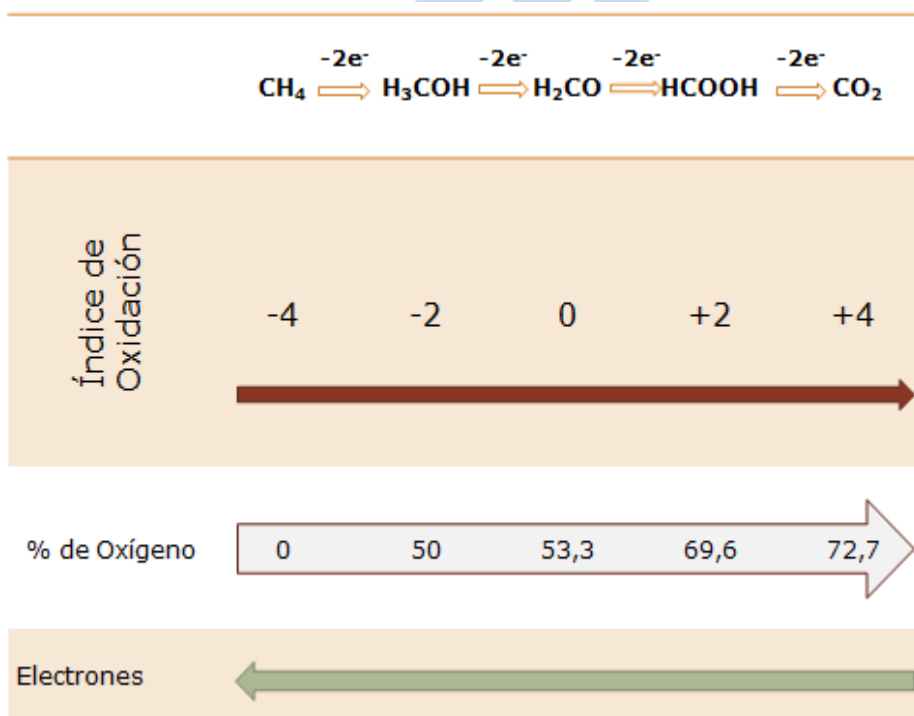


Figura 1.7.- Índice de oxidación y porcentaje de oxígeno (%)

La oxidación de nutrientes (glúcidos, ácidos grasos y aminoácidos) tiene lugar, de forma controlada, en diferentes etapas, de tal manera que se aprovecha con mayor eficacia la energía liberada. Una consecuencia directa de este mecanismo es que, entre los nutrientes iniciales y la generación de energía al final del proceso, se forman varias moléculas con diferentes grados de oxidación. Algunas de ellas pueden ceder uno o dos electrones al oxígeno y producir intermediarios parcialmente reducidos, que se denominan especies reactivas del oxígeno (EROs o también conocidas por sus siglas en inglés, ROS), tales como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Figura 1.8).

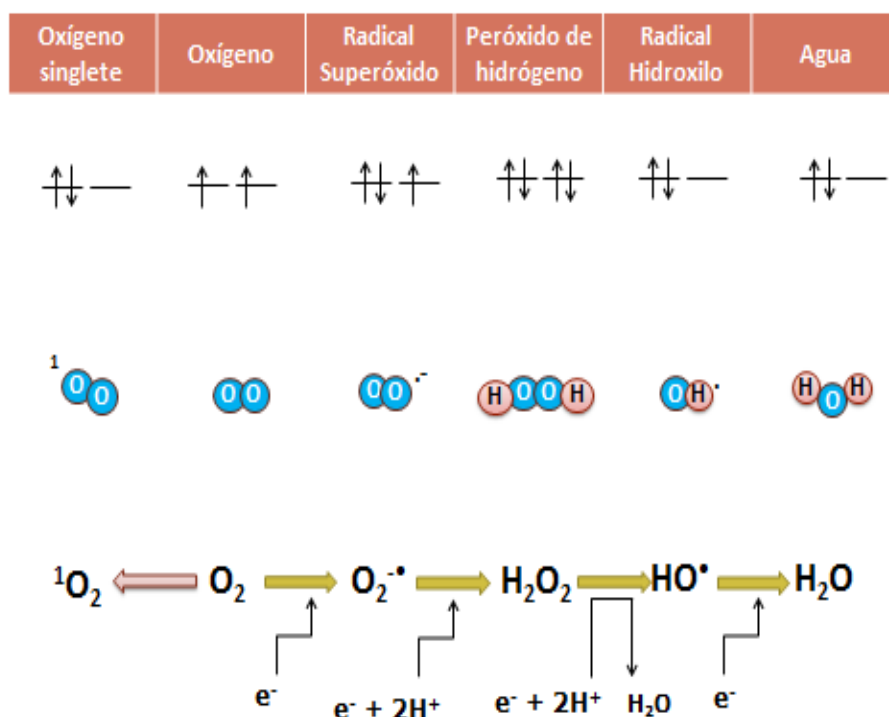
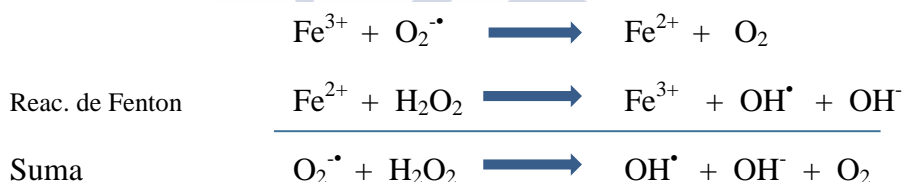


Figura 1.8.- La estructura electrónica del oxígeno hace que sea susceptible de reducciones parciales, produciéndose Especies Reactivas de Oxígeno

Las especies reactivas $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 pueden combinarse mediante la reacción de Haber-Weiss originando el radical OH^{\cdot} , según la siguiente reacción:



Esta reacción, aunque termodinámicamente favorable, es cinéticamente muy lenta y necesita la presencia de metales de transición, como hierro o cobre (Halliwell y Gutteridge 1990). Un mecanismo propuesto para la reacción de Haber-Weiss es el siguiente:



La presencia de uno o varios electrones desapareados hace que estas especies sean paramagnéticas y, a veces, las convierte en altamente reactivas. Sería deseable que el oxígeno tomase de una vez cuatro electrones y generase directamente agua, pero dada la estructura electrónica del oxígeno, la mayoría de las reacciones de óxido-reducción dentro de la célula involucran como máximo dos electrones que la molécula no puede aceptar a la vez, convirtiéndose en H_2O_2 , o si acepta un único electrón, produciendo $O_2^{\cdot -}$. Sólo la enzima citocromo oxidasa puede transferir los cuatro electrones de forma casi simultánea para generar agua.

La fuente intracelular más importante de $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 es la mitocondria, seguida de los peroxisomas (Boveris y cols. 1972). Otra

fuelle de $O_2^{\cdot -}$ son los leucocitos polimorfonucleares, cuya función involucra específicamente la generación de estos oxidantes, por el sistema NADPH oxidasa, como primera línea de defensa contra posibles patógenos (Babior y cols. 1973; Markert y cols. 1984). En este caso, las especies oxidantes cumplen un papel beneficioso ya que impiden la proliferación de tales agentes.

Se ha identificado una nueva especie oxidante llamada peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (Radi y cols. 1991; Beckman y cols. 1993) que se produce habitualmente como consecuencia de la reacción entre el $O_2^{\cdot -}$ y el óxido nítrico (NO). El NO es un metabolito normal en el metabolismo celular producido por la acción de la enzima óxido nítrico sintetasa sobre el aminoácido arginina. Fisiológicamente, el NO es un vasodilatador generado por las células endoteliales y macrófagos (Palmer y cols. 1987), pero el producto de la reacción con el $O_2^{\cdot -}$ es un oxidante casi tan poderoso como el OH^{\cdot} .

La reacción del radical OH^{\cdot} con iones carbonato (CO_3^{-2}) da lugar al radical carbonato ($CO_3^{\cdot -}$), que es una especie bastante reactiva pero con una vida media más larga que OH^{\cdot} .



Existe una clara relación entre la vida media de las EROs y la especificidad de su reactividad. Algunas especies reactivas del oxígeno, como es el caso de H_2O_2 , son muy estables, pueden difundir a grandes distancias y son capaces de elegir la molécula sobre la que actúan. Otras, en cambio, como el radical OH^{\cdot} , tienen una vida muy corta (10^{-9} sg) y presentan una reactividad tan alta que su rango de actuación se encuentra entre 1 y 5 diámetros moleculares de su lugar de formación, por lo que son capaces de interactuar con todo tipo de sustratos, presentando por ello una mayor toxicidad. Asimismo, los radicales libres pueden actuar sobre moléculas presentes en el citosol

tales como los nucleótidos y los grupos tioles (Halliwell y Gutteridge 1988; Dizdaroglu 1991). Una estructura celular especialmente susceptible al ataque de los radicales libres es la membrana, cuyos distintos componentes (enzimas, proteínas receptoras, canales iónicos y cadenas lipídicas) pueden ser dañados por los radicales libres conduciendo a la muerte celular (Halliwell y Gutteridge 2007).

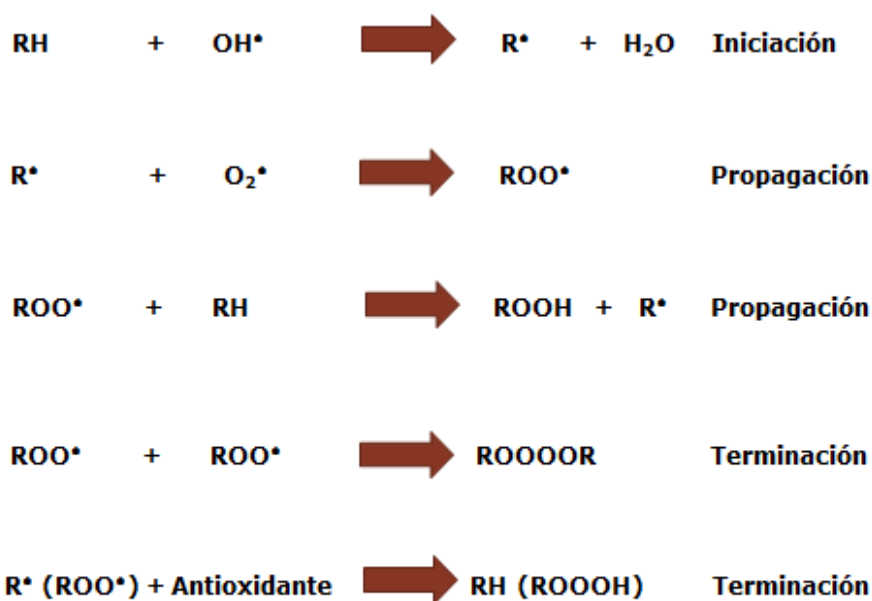
1.5 Efectos de las EROs sobre moléculas biológicas

1.5.1 *Peroxidación lipídica*

La **peroxidación lipídica o lipoperoxidación** es una reacción autocatalítica en la que las especies reactivas del oxígeno o los radicales libres sustraen átomos de hidrógeno a las moléculas de ácido grasos poliinsaturados. La reacción termina cuando dos moléculas de peróxidos colisionan entre sí o cuando reaccionan con algún antioxidante disponible (Figura 1.9).

Los ácidos grasos insaturados son las moléculas más sensibles al daño oxidativo. Animales con baja tasa de ácidos grasos insaturados tienen un menor grado de peroxidación lipídica y su envejecimiento es más lento (Barja 2002).

Algunos metales sin capacidad redox como el Sc^{3+} , Ga^{3+} , In^{3+} , Be^{3+} , Y^{3+} y La^{3+} estimulan la oxidación lipídica iniciada por el Fe^{2+} y en particular la mielina es especialmente susceptible a la oxidación en presencia de estos cationes (Verstraeten y cols. 1997; Verstraeten y cols. 1998).



RH : ácido graso poliinsaturado; ROO[•] : radical lipoperóxido
 R[•] : radical de ácido graso; ROOH : hidroperóxido; ROOOOR : tetróxido

Figura 1.9.- Evolución de la lipoperoxidación

Entre los productos finales del proceso de peroxidación lipídica se encuentra el malondialdehído (MDA), que se utiliza como marcador de dicha reacción. Los productos de degradación pueden difundir lejos del lugar de su formación provocando lesiones como pérdida de la permeabilidad celular y ruptura de gradientes iónicos transmembrana, entre otras. Asimismo, pueden alterar la actividad de fosfolipasas e inducir la liberación de ácido araquidónico, implicados en el proceso inflamatorio (Davies y cols. 1984).

1.5.2 *Oxidación de azúcares*

La glicación es la oxidación no enzimática de azúcares reductores que se combinan mediante su grupo aldehído con el grupo

amino de proteínas y en menor medida de lípidos o ácidos nucleicos (Bucala y cols. 1984; Bucala y cols. 1993). En una primera etapa de esta unión se forman aldíminas o bases de Schiff, moléculas inestables que con el tiempo se transforman en compuestos de Amadori o fructosaminas. En una segunda etapa, estos compuestos se transforman mediante la reacción de Maillard, que incluye múltiples reacciones como deshidratación, condensación cíclica, entrecruzamientos intermoleculares y oxidación por EROs. Los compuestos finales obtenidos se conocen como productos de la glicación avanzada (PGAs, o AGEs por su denominación inglesa “advanced glycation end products”) (Figura 1.10).

La reacción de Maillard se utiliza en la industria alimentaria para dar color, olor y sabor a los alimentos, pero también puede alterar la función de la proteína involucrada o incluso dar lugar a productos cancerígenos (Valenzuela y Ronco 2007). En condiciones fisiológicas, la glicación se ve favorecida por una alta concentración de azúcar (diabéticos) y/o un entorno oxidativo elevado (por ejemplo, presencia de metales). Los PGAs tienen un amplio espectro de efectos patológicos, como pueden ser alteraciones en la permeabilidad vascular debido a su reacción con el óxido nítrico y la inducción a la secreción de citoquinas que aumentan el estrés oxidativo (Bucala y cols. 1991; Bucala y cols. 1993).

La combinación de reacciones de glicación y oxidación, que se conoce como glicoxidación, genera productos altamente aterogénicos (Actis Dato y Rebolledo 2000) y está asociada con procesos relacionados con el envejecimiento, la diabetes, las cataratas, el Alzheimer, la aterosclerosis, las nefropatías o las alteraciones vasculares periféricas, entre otras (Sakurai y Tsuchiya 1988; Miyata y cols. 1993; Ramasamy y cols. 2007; Glenn y Stitt 2009; Pertyńska-Marczewska y cols. 2009).

La incubación de azúcares con lípidos con grupos amino libres da lugar a productos liposolubles con propiedades características de PGAs. Estos productos están relacionados con la oxidación de ácidos grasos. Por otro lado, la glucosa es capaz de formar PGAs con las

lipoproteínas, tanto con su parte proteica como lipídica (Bucala y cols. 1993). Así lo hace con lipoproteínas de baja densidad (LDL) aisladas de pacientes diabéticos, lo que podría indicar que la glicación juega un papel importante en la aterogénesis *in vivo* (Picard y cols. 1992; Pamplona y cols. 1993).

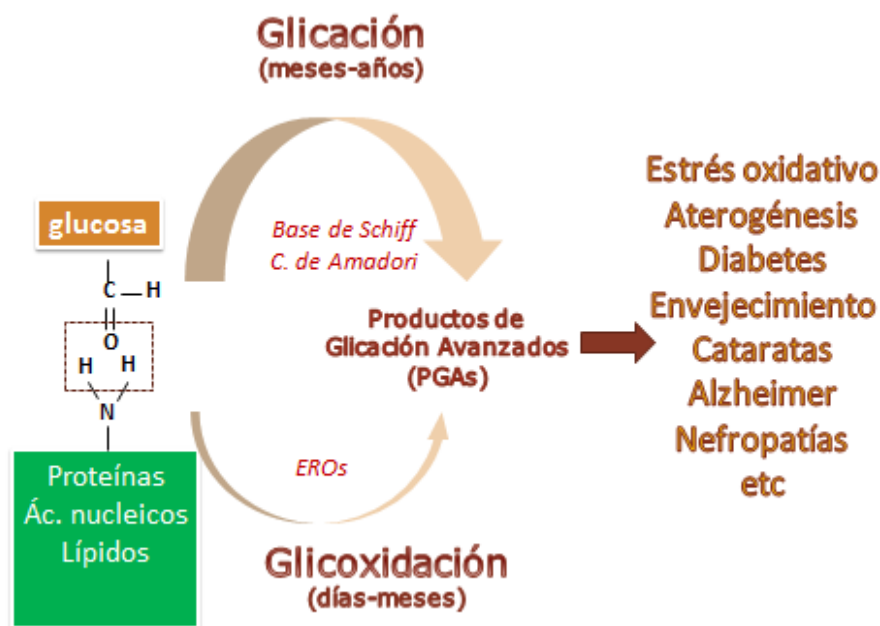


Figura 1.10.- Reacciones oxidantes

Aunque los grupos amino primarios de los ácidos nucleicos con los glúcidos reductores son menos reactivos que los proteicos, se ha observado glicación de nucleótidos, lo que provoca anomalías en el patrón del ADN. En condiciones de hiperglucemia estos procesos pueden acelerarse y dar como resultado un “envejecimiento celular” temprano (Méndez 2003).

1.5.3 ***Oxidación de proteínas***

La oxidación proteica puede venir provocada por cualquier factor que ocasione estrés oxidativo. Un aumento de los EROs, un deterioro en el funcionamiento de los sistemas antioxidantes, una mayor susceptibilidad de las proteínas a la oxidación o una menor capacidad de reparación de las proteínas oxidadas pueden aumentar la cantidad de proteínas dañadas (Nyström 2005). Las alteraciones provocadas en la proteína pueden afectar a su estructura primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria, lo que puede influir de forma significativa en su función biológica.

La oxidación de proteínas se puede clasificar en reversible o irreversible. La reversible constituye, en ocasiones, una forma de activar o desactivar proteínas que tienen una función en la regulación redox. La glutatiónilación y la s-nitrosilación (dos tipos de oxidación proteica) protegen las cisteínas en la formación de puentes disulfuro dentro de la conformación tridimensional de una proteína.

La oxidación irreversible se da por medio de cuatro mecanismos: la carbonilación, la ruptura de enlaces peptídicos, la nitración y la formación de enlaces proteína-proteína. Estas oxidaciones son ocasionadas por reacción de proteínas con EROs, lo que provoca la degradación o la agregación de proteínas.

Generalmente, la oxidación proteica viene acompañada por una modificación no reversible, lo que implicaría una pérdida de función, sobre todo si se dañan los aminoácidos involucrados en la estructura tridimensional o con un papel relevante en la reacción enzimática. En la mayoría de los casos, la pérdida de función tiene como consecuencia la proteólisis de la proteína dañada y una nueva síntesis de esa proteína (Díaz-Acosta y Membrillo-Hernández 2006).

1.5.4 ***Oxidación de ácidos nucleicos***

La oxidación del ADN se puede producir tanto a nivel mitocondrial como nuclear y probablemente es la causa de la mutagénesis espontánea, que puede estar implicada en la carcinogénesis. El daño oxidativo puede provocar una modificación de las bases nitrogenadas, un mal apareamiento en la siguiente replicación, la rotura de una o ambas hebras y/o la formación de uniones indeseables (cross-links) entre una molécula de ADN y otra de ADN o proteína.

El cáncer es el resultado de la acumulación de varios procesos que tienen lugar en un clon de células. Comienza con la fase de iniciación, en la que hay una mutación en el ADN de una célula somática, seguido de una promoción, en la que se estimula la expansión tumoral del clon mutado, y por último la progresión del tumor con su malignización (Zorrilla y cols. 2004) (Figura 1.11).

La **iniciación** del proceso cancerígeno requiere de la modificación permanente del material genético de una célula. Los posibles daños producidos por las EROs son continuamente revertidos por los sistemas de prevención y reparación celular, pero un aumento del estrés oxidativo puede hacer que una pequeña parte de las lesiones escapen a su control, con el consiguiente aumento de las lesiones en los ácidos nucleicos (Dreher y Junod 1996).

La **promoción** del tumor puede verse favorecida por la modulación temporal por parte de las EROs de genes relacionados con la proliferación o muerte celular. Por otra parte, las EROs pueden provocar un incremento del Ca^{++} citosólico y este ión puede inducir a proto-oncogenes como *c-fos*, o influir en la función de la proteína quinasa dependiente de Ca^{++} (PKC) que a su vez, participaría en la aparición y desarrollo de tumores (Cerviño 2007). Las EROs también son capaces de modular directamente la actividad de PKC mediante la oxidación de residuos de cisteína en el dominio regulador de la enzima. La activación de la expresión de genes relacionados con la promoción

tumoral, puede deberse a una acción directa de los niveles redox intracelulares sobre los factores de transcripción, o indirectamente a una modificación de las proteínas cromosómicas como respuesta a una lesión del ADN (Boticario y Cascales 2012).

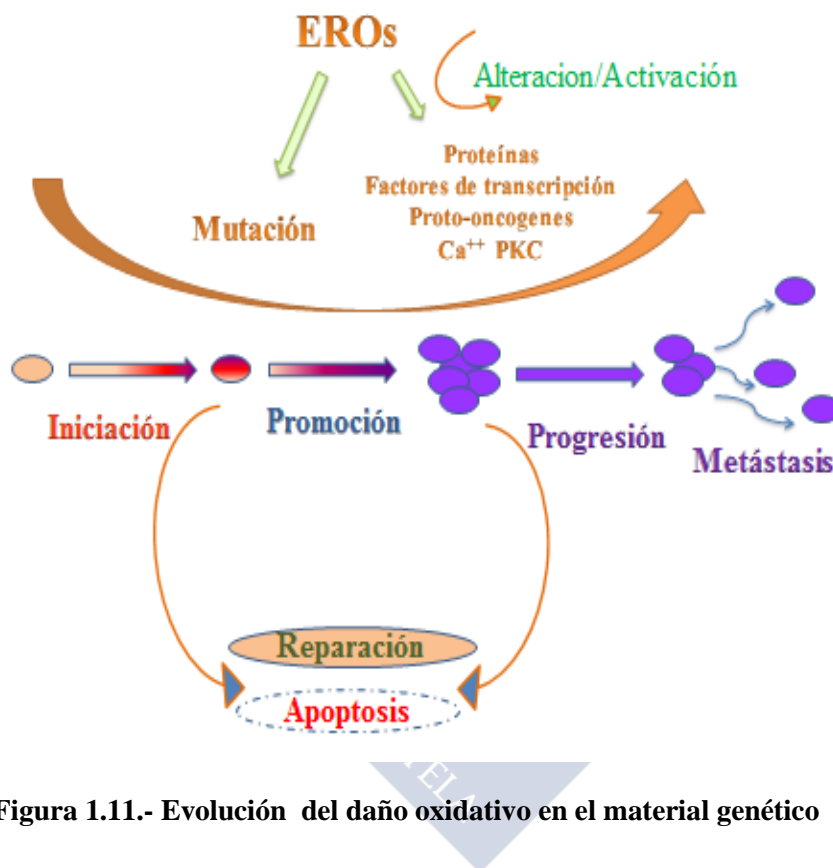


Figura 1.11.- Evolución del daño oxidativo en el material genético

La **progresión** del tumor, que deriva en su malignización, es la última fase del cáncer y se caracteriza por un crecimiento celular acelerado, camuflaje inmunológico, invasión tisular y metástasis. Una persistente concentración elevada de EROs, que puede venir acompañada de una disminución de la maquinaria antioxidante, incrementa la inestabilidad genómica celular. Esta inestabilidad es un importante factor a tener en cuenta en la posible evolución tumoral indeseable (Toyokuni y cols. 1995; Klaunig y cols. 2010).

1.6 Defensa antioxidante

Los organismos aerobios están expuestos a un estado estacionario basal de oxidantes que, en la mayoría de los casos, se generan de forma accidental. El desequilibrio entre la producción de EROs y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante de su acción, provoca un estrés celular conocido como estrés oxidativo (EO) (Figura 1.12). Éste puede venir dado tanto por un aumento de las EROs como por un descenso de la capacidad de prevención, control y reparación de los daños que provoca.

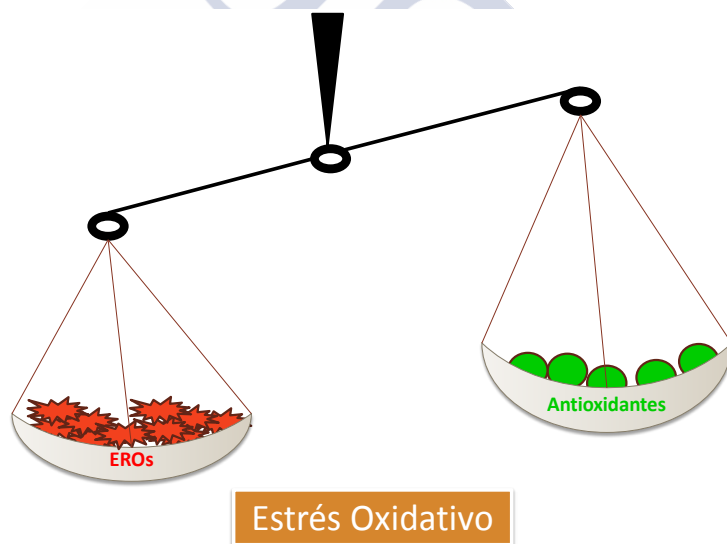
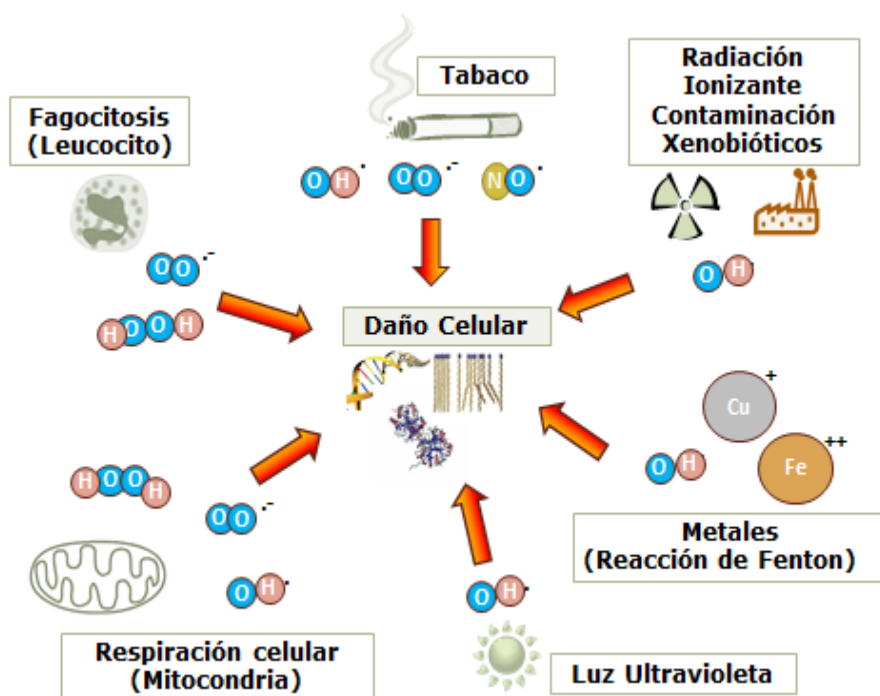


Figura 1.12.- "No todos los radicales libres son malos, no todos los antioxidantes son buenos. La vida es un balance entre los dos" (Halliwell 2006)

FUENTES MÁS IMPORANTES DE RADICALES LIBRES



Las células cuentan con un complejo sistema de defensa antioxidante constituido por varios componentes que se pueden clasificar en diferentes categorías dependiendo de su modo de actuación y del tipo de molécula (Fang y cols. 2002; Lee y cols. 2004).

Los **quelantes de metales** representan la primera línea de defensa antioxidante. Estos compuestos, al bloquear a los metales, impiden que catalicen las reacciones que dan lugar a la formación de radicales libres o especies reactivas del oxígeno (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Primera línea de defensa antioxidante.

Quelante	Compuesto bloqueado
Transferrina	Hierro
Lactoferrina	Hierro
Haptoglobina	Hemoglobina
Hemopexina	Hemo
Ceruloplasmina	Cobre
Albúmina	Cobre

Los **compuestos de bajo peso molecular y las enzimas antioxidantes** forman parte de la segunda línea de defensa celular. Estos compuestos desactivan las EROs y otras especies reactivas antes de que puedan dañar las biomoléculas.

Muchos de los compuestos antioxidantes no enzimáticos se pueden encontrar en los alimentos, siendo los más conocidos la vitamina E, vitamina C, carotenoides y polifenoles (Balboa y cols. 2013; Lage-Yusty y cols. 2014). Muchos de ellos son sintetizados por los vegetales debido a que sus condiciones de vida en el medio natural pueden llegar a ser extremas, con concentraciones salinas o radiaciones solares en ocasiones muy elevadas. En estas condiciones, la probabilidad de formación de EROs aumenta, ésto hace que las células vegetales, como mecanismo de defensa, aumenten la formación de compuestos antioxidantes capaces de contrarrestar el posible ataque de

estas sustancias, ya sea directamente o restaurando sistemas con capacidad antioxidante (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Antioxidantes no enzimáticos

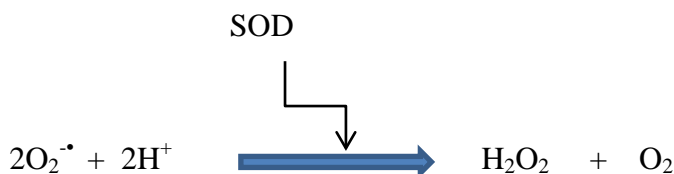
Compuesto	Acción
Ascorbato Vitamina C	Secuestrante de radicales hidrofílicos Inhibición de la peroxidación lipídica
Urato	Secuestrante de radicales hidrofílicos
Glutación (GHS)	Ligado a sistemas enzimáticos
Compuestos tiol (Captopril, N-acetil cisteína)	Precusores del glutatión
Tocoferoles y tocotrienoles Vitamina E	Secuestrante de radicales lipofílicos
Polifenoles Compuestos fenólicos	Secuestrante de radicales lipofílicos
Carotenoides Vitamina A	Secuestrante de radicales lipofílicos
Ubiquinol	Secuestrante de radicales lipofílicos
Selenio	Ligado a sistemas enzimáticos
Bilirrubina	Inhibe peroxidación lipídica

Las enzimas antioxidantes son esenciales para la vida de las células aerobias, puesto que mantienen, dentro de unos niveles aceptables, las concentraciones de especies reactivas del oxígeno producidas en diversos procesos celulares (Tabla 1.4). El hecho de que la célula disponga de un dispositivo de defensa tan abundante, pone en evidencia el importante grado de toxicidad que poseen los radicales libres.

Tabla 1.4. Antioxidantes enzimáticos

Compuesto	Acción
Superóxido dismutasa (SOD)	Cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 .
Catalasa (CAT)	Transforma el peróxido de hidrógeno en agua
Glutación peroxidasa (GPx)	Convierte los hidroperóxidos en agua
Glutación reductasa (GR)	Reduce antioxidantes
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	Mantiene entorno reductor

La **superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1)**, descubierta por McCord y Fridovich (1969), cataliza la conversión del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), de acuerdo con la siguiente fórmula:



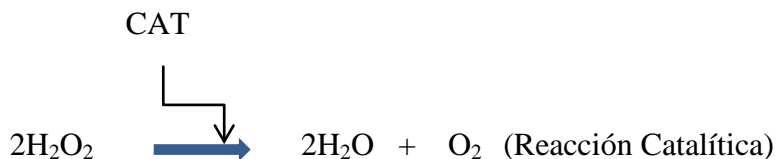
Constante de velocidad = $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

Existen 3 tipos de SOD diferentes que catalizan la misma reacción pero que difieren en el metal que contienen en su centro activo. La metaloenzima CuZnSOD, presente sobre todo en el citosol, pero también en los lisosomas, núcleo, mitocondria y peroxisomas y en cuyo sitio activo contiene cobre, que por mecanismo redox, participa en las reacciones de dismutación (Halliwell y Gutteridge 2007). El zinc por su parte, actuaría como estabilizador de la enzima. Se ha descrito otra CuZnSOD presente en el líquido extracelular que podría estar implicada en procesos inflamatorios (Karlsson y Marklund 1988).

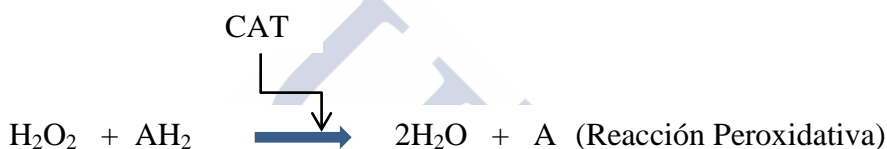
La variedad de SOD que contiene manganeso en su sitio activo (MnSOD) se localiza en la matriz mitocondrial de células eucariotas como un tetrámero, y en procariotas en formas de monómero, dímero, trímero o tetrámero. Llama la atención la similitud de secuencia de aminoácidos de esta enzima, independientemente de que sea de animales, plantas o bacterias y diferente en dicha secuencia a la enzima que lleva Cu en su molécula. A su vez, resulta muy similar a la SOD que contiene hierro (FeSOD) y que se encuentra casi exclusivamente en procariotas y algas (Halliwell y Gutteridge 1990).

La **Catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6)** es una enzima que se ubica preferentemente en los peroxisomas, cataliza la inactivación de dos

moléculas de H_2O_2 convirtiéndolas en agua y oxígeno, o de una, con la transformación de una molécula donadora de electrones.



Constante de velocidad = $1,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$



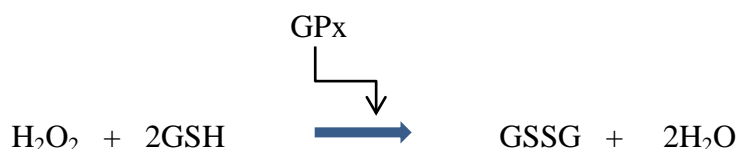
La constante de velocidad de la reacción peroxidativa es muy inferior a la reacción catalítica y varía según el sustrato, que pueden ser desde compuestos fenólicos o alcoholes hasta nitritos y aminas primarias.

La mayor velocidad de reacción del proceso catalítico hace que a concentraciones altas de H_2O_2 predomine sobre el proceso peroxidativo que además necesita una concentración suficiente de la molécula donadora (AH_2) (Chance y cols. 1979).

La catalasa se encarga de la eliminación del H_2O_2 que se encuentra en los peroxisomas de muchos tejidos, sobre todo en hígado y riñón. El sitio activo de la enzima es un grupo hemo (Somani y cols. 1997).

La **glutación peroxidasa (GPx) (EC 1.11.1.9)** cataliza la reducción de peróxidos inorgánicos, hidroperóxidos orgánicos y peróxidos lipídicos, utilizando como sustrato el glutatión (GSH), que es transformado en glutatión oxidado (GSSG). Esta enzima junto con la glutatión reductasa (que regenera el GSH a partir del GSSG producido),

juega un papel primordial en la regulación del H_2O_2 de las células animales (Halliwell 1981).



$$\text{Constante de velocidad} = 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

Es una metaloproteína tetramérica que contiene 4 átomos de selenio por molécula, aunque en mamíferos existe una variedad dimérica sin selenio que no puede descomponer el peróxido de hidrógeno (Lawrence y Burk 1976). El H_2O_2 presente en el citosol o procedente de orgánulos como mitocondrias y retículo endoplásmico, es eliminado fundamentalmente por GPx presente mayoritariamente en el citosol y en menor cuantía en la mitocondria (López Torres 2002).

La síntesis de estos componentes debe estar muy bien regulada, ya que las defensas antioxidantes ante un estrés oxidativo inducido por un metal pesado, son diferentes a aquellas que responden a un estrés producido por el anión superóxido o el peróxido de hidrógeno. Componentes diferentes deberán ser activados en proporciones diferentes. Así por ejemplo, si se induce un alto nivel de SOD, puede llegar a generarse demasiado peróxido de hidrógeno lo que origina un estrés debido a la elevada presencia de este oxidante. Por lo tanto, es deseable que la expresión de SOD se acompañe de la inducción de un gen que codifique una enzima capaz de remover el peróxido de hidrógeno, como podría ser la catalasa o una peroxidasa.

Finalmente, los **sistemas de reparación** representan la tercera y última línea de defensa antioxidante. Estos sistemas corrigen las lesiones producidas en las biomoléculas dañadas por las EROs (Tabla 1.5) mediante mecanismos celulares específicos. Si no se recupera el equilibrio se producirán disfunciones que pueden desembocar en la muerte celular.

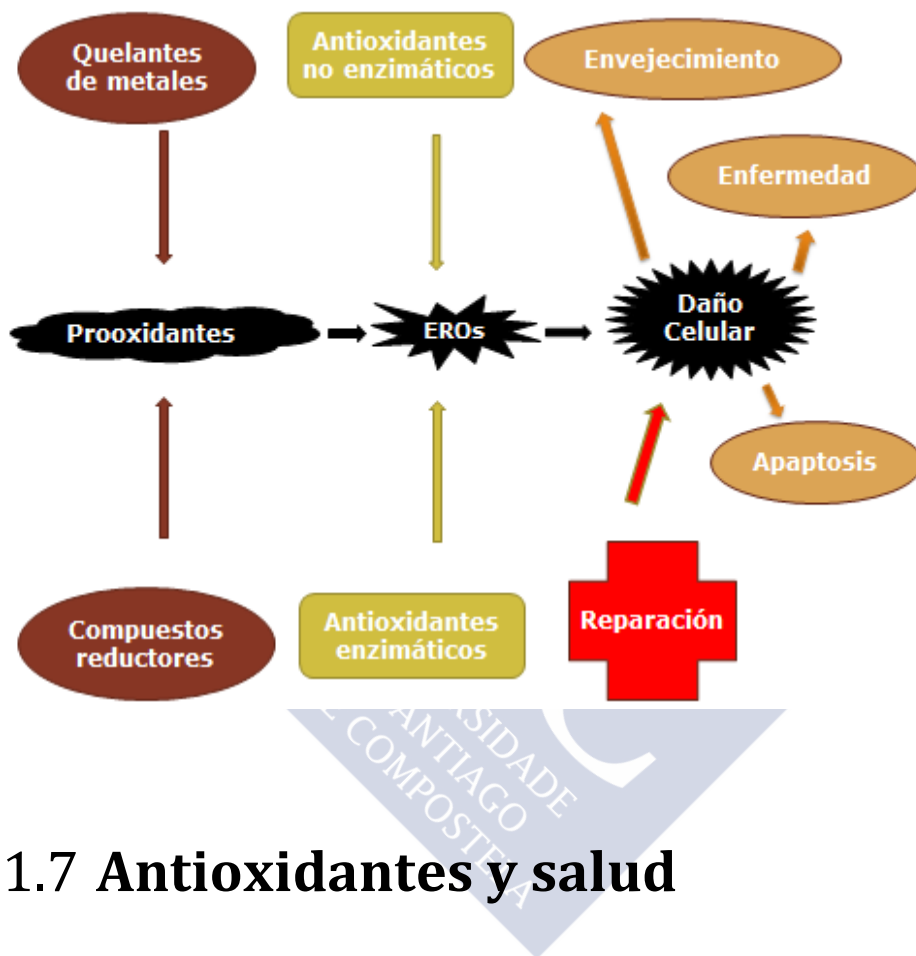
Aunque se ha demostrado que individualmente algunos aminoácidos son más susceptibles a la oxidación que otros, una proteína, dependiendo de su conformación tridimensional, puede exponer o no esos aminoácidos a la oxidación. La enzima metionin sulfóxido reductasa repara las metioninas oxidadas que se encuentran protegiendo la zona catalítica de la proteína, evitando que las EROs puedan dañarla (Levine y cols. 1996).

Sin embargo los radicales libres no siempre son perjudiciales para el organismo. A concentraciones bajas pueden tener una función reguladora. Así, actuando como segundo mensajero que regula la expresión de citoquinas, el peróxido de hidrógeno estimula factores que intervienen en procesos inmunes o que pueden controlar las células inflamatorias implicadas en procesos agudos de inflamación (Murray y Nathan 1999; Babior 2000).

Tabla 1.5.- Sistema de reparación de daños

Sistema de reparación	Acción
Puntos de control del ciclo celular	Reparación de ADN y ARN
Metionina sulfóxido reductasa	Reparación de proteínas y lípidos
Tioredoxin reductasa	Mantenimiento de proteínas tiólicas
Glutación peroxidasa	Reparación de lípidos

DEFENSA ANTIOXIDANTE



1.7 Antioxidantes y salud

Como ya se comentó anteriormente, algunas vitaminas y minerales que se encuentran en los alimentos son sustancias antioxidantes que previenen o disminuyen la oxidación, por lo tanto es conveniente su consumo para proteger nuestro organismo de la oxidación.

El zinc induce la síntesis de la metalotioneína, una proteína que actúa como agente quelante de metales con capacidad redox (Fe^{2+} y Cu^{2+}) y atrapa radicales hidroxilo. Además, es un constituyente de la

enzima antioxidante CuZnSOD (Olin y cols. 1993). Por otro lado, también podría unirse a macromoléculas (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos), en sitios que, de otra manera, estarían ocupados por metales prooxidantes. Por ello, el zinc parece tener una función fisiológica como parte de las defensas antioxidantes del organismo, puesto que su deficiencia está asociada a una situación de estrés oxidativo (Sullivan y cols. 1980; Tate Jr y cols. 1999).

Estudios realizados en una población a diferentes edades (de 2 a 70 años) indican que con la edad se produce un aumento del estrés oxidativo como consecuencia, entre otras causas, de alteraciones en las enzimas antioxidantes (Ínal y cols. 2001).

La utilización de miméticos de las enzimas SOD y CAT muestra un aumento en los niveles de estas enzimas tanto en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Melov y cols. 2000) como en animales transgénicos de *Drosophila melanogaster* (Orr y Sohal 1994) en los cuales la esperanza de vida se incrementa. Además, estos miméticos también se utilizan para prevenir el daño neuronal en ratas con neuropatologías inducidas (Rong y cols. 1999).

Se sabe que el daño producido por la liberación de radicales libres juega un papel importante en ciertas patologías relacionadas con el envejecimiento (Droy-Lefaix 1997; Marcus y cols. 1998). La administración de compuestos antioxidantes podría tener un efecto restaurador del estado fisiológico y concretamente de la función inmune durante la vejez, momento de la vida en el cual este sistema defensivo se altera, deprimiéndose en muchos de sus aspectos fundamentales (Miller 1996), y en el que los niveles de defensas antioxidantes parecen disminuir (Leibovitz y Siegel 1980). Ya que en el sistema inmune la función celular está particularmente ligada a la liberación de radicales de oxígeno, es necesario disponer de defensas antioxidantes que protejan la vida de estas células y mantengan su actividad normal.

En personas mayores de 55 años con propensión a desarrollar degeneración macular senil, la suplementación de la dieta con

antioxidantes reduce la probabilidad de desarrollarla (Age-Related Eye Disease Study Research Group 2001; Falsini y cols. 2003).

En general, en la mayoría de individuos con cáncer los niveles de antioxidantes se encuentran por debajo de lo normal, lo que parece indicar un importante papel de la modulación redox celular en esta enfermedad (Oberley y Oberley 1997).

En pacientes con carcinoma cervical, existe un aumento de la peroxidación lipídica, así como niveles significativamente bajos de GSH, GPx, SOD, glutatión-S-transferasa, vitamina C y vitamina E (Manju y cols. 2002).

También en la leucemia linfocítica crónica se observa una disminución de la actividad de la SOD y de la GPx y, a pesar de que la relación GSSG/GSH no se modifica, la oxidación lipídica y el daño en el ADN aumentan (Oltra y cols. 2001).

Aunque parezca paradójico, algunos estudios muestran como una posible terapia anticancerígena la inhibición de la SOD, a fin de aumentar los niveles del anión superóxido, ya que éste es un importante activador de la apoptosis (Huang y cols. 2000).

En individuos sanos, la óxido nítrico sintetasa endotelial produce óxido nítrico que atrapa el anión superóxido; sin embargo, en las arterias de los diabéticos el endotelio es una fuente adicional de superóxido debido al mal funcionamiento de la óxido nítrico sintetasa endotelial (Guzik y cols. 2002). Además, en estos pacientes el estrés oxidativo de los monocitos está significativamente aumentado debido al incremento de la actividad de la NADPH oxidasa (Yasunari y cols. 2002).

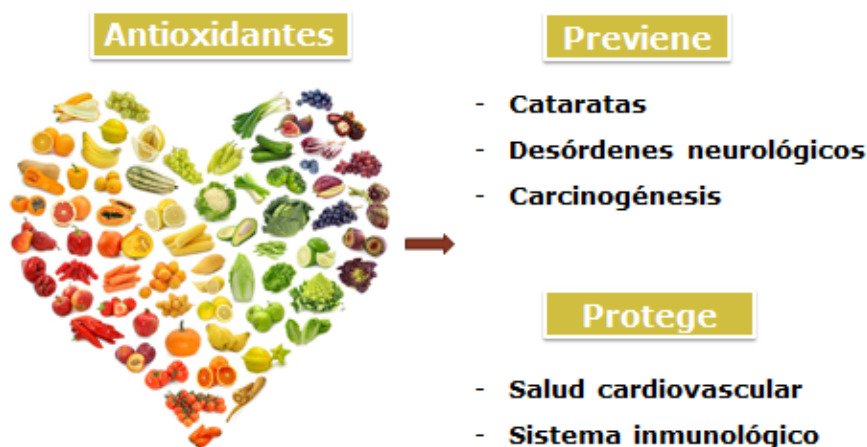
La mayoría de los antioxidantes, en individuos con daño cerebrovascular, se reducen inmediatamente después del episodio isquémico y van aumentando en los días siguientes, lo que sugiere la presencia de estrés oxidativo (Cherubini y cols. 2000). Este incremento del estrés oxidativo también se observa en pacientes sometidos a diálisis renal (Clermont y cols. 2000).

Estudios realizados en personas que sufren enfermedad coronaria, ponen de manifiesto que la actividad de la SOD extracelular ligada al endotelio se encuentra disminuida, lo que determina una mayor actividad del anión superóxido y, por tanto, una menor disponibilidad de NO. Así mismo, se observa un aumento de la xantina oxidasa ligada al endotelio (Landmesser y cols. 2000; Landmesser y cols. 2002).

Por tanto, existe una correlación inversa entre los niveles plasmáticos de antioxidantes y el riesgo de enfermedad coronaria o muerte por infarto de miocardio (Riemersma y cols. 1991; Kritchevsky y cols. 1995) y la suplementación de la dieta con antioxidantes, particularmente con vitamina E, parece prevenir estos procesos (Hodis y cols. 1995; Takamatsu y cols. 1995).

Los polifenoles son los antioxidantes más importantes que se encuentran en las plantas. Asimismo, aquellos que están presentes en el vino desempeñan una importante acción protectora en las alteraciones cardiovasculares al regular la actividad de las enzimas antioxidantes (Parks y Booyse 2002).

ANTIOXIDANTES Y SALUD







OBJETIVOS



2 Objetivos

En Occidente, en los últimos años es cada vez más frecuente la utilización de algas en la alimentación humana, lo que hace que su demanda sea mayor. En general, se considera que las algas poseen componentes con propiedades beneficiosas para el organismo, como pueden ser minerales, vitaminas y fibra dietaria. Al poseer un contenido muy bajo tanto en grasa como en ácidos grasos saturados y una adecuada calidad proteica, podrían ser utilizadas como suplemento en las dietas contribuyendo a complementar el alimento.

La composición de las algas varía ampliamente entre las diferentes especies dependiendo sobre todo del tipo de alga al que pertenecen (verde, parda o roja), extremo éste que es necesario tener en cuenta a la hora de realizar su estudio.

La potencial importancia de las algas en la alimentación hace necesario un conocimiento amplio de sus posibilidades de explotación y utilización, y de sus efectos en los consumidores. Por ello, un primer objetivo de este trabajo es analizar la composición de cinco algas diferentes, dos pardas: *Undaria pinnatifida* (Wakame) e *Himanthalia elongata* (Espagueti de mar); dos verdes: *Ulva rigida* (Lechuga de mar) y *Codium tomentosum* (Ramallo de mar); y por último, una roja: *Porphyra purpurea* (Nori), todas ellas recogidas en las costas de Galicia, y estudiar el efecto de su inclusión en la dieta sobre la calidad nutritiva del alimento, utilizando para ello animales de experimentación en período de crecimiento.

Tras conocer la calidad nutritiva de las algas, el segundo objetivo de este estudio consiste en analizar cómo influye la incorporación de las algas antes mencionadas a la dieta, sobre algunos

parámetros sanguíneos que permiten valorar la función hepática, renal y cardiovascular.

Debido a que las enzimas implicadas en los procesos digestivos se adaptan a la dieta, un tercer objetivo es determinar, en animales que consumen piensos con Wakame, Lechuga de mar y Nori, la actividad de las disacaridasas maltasa, sacarasa y lactasa, así como la actividad enzimática de la leucinoaminopeptidasa y la gamma-glutamyl transpeptidasa en mucosa intestinal, hígado y riñón, órganos fundamentales en el metabolismo.

Por otra parte, el envejecimiento y la mayoría de las enfermedades degenerativas, se asocian al fenómeno de oxidación celular mediada por radicales libres, ya que las especies reactivas de oxígeno producen lesiones tisulares que se inician con daños en proteínas, lípidos, glúcidos y ADN. Para proteger a los tejidos frente a estos efectos adversos, el organismo cuenta con sistemas de defensa antioxidantes de tipo no enzimático y enzimático. Entre estos últimos se incluyen la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa. Teniendo en cuenta que la composición de la dieta puede modular la peroxidación lipídica en tejidos, el estudio de su influencia en la actividad de estas enzimas antioxidantes en mucosa intestinal, hígado, riñón y corazón como mecanismo endógeno que protege del daño oxidativo, se plantea como un cuarto objetivo de este trabajo, ya que conocer si el consumo de algas marinas modifica la actividad antioxidante endógena podría aumentar su valor como alimento o aditivo para consumo humano, y así potenciar su expansión en el mercado.



Material y Métodos



3 Material y métodos

3.1 Algas objeto de estudio

Para la realización de este trabajo se analizan un total de cinco algas, dos pardas (Wakame y Espaguete de mar), dos verdes (Lechuga de mar y Ramallo de mar) y una roja (Nori) proporcionadas por la empresa Porto-Muiños situada en la localidad de Cambre (A Coruña, España).

La recogida de las algas se lleva a cabo principalmente en primavera y verano, se limpian y se secan en corriente de aire, a una temperatura inferior a 50 °C para evitar su deterioro a la vez que se facilita la eliminación de la mayor parte de agua. A continuación, se trocean, muelen, homogeneizan y guardan en bolsas de plástico selladas lo que permite que se conserven y almacenen hasta 3 años sin pérdidas significativas de sus propiedades.

Para llevar a cabo los estudios enzimáticos se escoge el alga más consumida de cada tipo, entre aquellas que forman parte de este trabajo, Wakame, Nori y Lechuga de mar.

3.2 Determinaciones analíticas en las algas

Una vez que llegan a nuestro laboratorio las harinas de las distintas algas se procede al análisis de sus características y composición básica. Se toman partes alícuotas y en todos los casos las determinaciones se llevan a cabo por triplicado.

3.2.1 *Humedad*

La humedad se determina mediante el analizador electrónico SCALTEC SMO 01. Se realiza teniendo en cuenta la pérdida de peso sufrida durante la desecación a la que se someten las muestras. Con los datos obtenidos se calcula el porcentaje de humedad.

3.2.2 *Vitaminas y minerales*

El contenido en minerales se determina mediante las técnicas de espectrometría de emisión óptica ICP-OES en un espectrofotómetro Perkin Elmer 4300DV y por Espectrometría de Absorción Atómica en Horno de Grafito. Se realizan varias pruebas diluyendo con ácido nítrico y con una mezcla de ácido ascórbico, tritón y antiespumante, también se usan diferentes modificadores de matriz. Se toman los valores en los cuales se obtienen mejores recuperaciones del material certificado que se usa.

Para la preparación de los blancos y de las muestras de las especies marinas ensayadas, se sigue el método de Förster y Wittmann (1983) modificado. Para ello, se sitúan las muestras en recipientes con H₂O₂ al 30 % (Merck Suprapur) y se calientan progresivamente hasta que se vuelven transparentes. Los residuos así obtenidos tras la

evaporación se disuelven en $\text{HNO}_3\text{-HCl}$ (1:3) (Merck Supapur), se someten a digestión a $110\text{ }^\circ\text{C}$ y se filtran a través de una membrana de nylon de 0,45 micras de tamaño de poro.

Todo el material en contacto con la muestra debe ser descontaminado, para lo cual se mantiene durante 24 horas en ácido nítrico, se lava con agua desionizada y se pasa por agua MilliQ.

Para la cuantificación de minerales en suero sanguíneo se añade HNO_3 en la proporción 1:1, se calienta 10 minutos a $110\text{ }^\circ\text{C}$ y se diluye con agua MilliQ hasta 10 ml.

Para establecer la composición en vitaminas, se requiere una manipulación adecuada, con un ambiente poco oxidativo y baja temperatura para la correcta conservación de las vitaminas y su posterior análisis. La vitamina B_{12} se cuantifica por el método microbiológico, la biotina mediante el procedimiento turbidimétrico y en cuanto a las demás vitaminas analizadas, su determinación se realiza mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (AOAC 1995)

3.2.3 ***Glúcidos, fibra cruda, fibra alimentaria y cenizas***

La fibra cruda se determina gravimétricamente después de una digestión ácida con ácido sulfúrico y otra básica con hidróxido sódico y posterior calcinación a $600\text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 3.1). En cuanto a la fibra alimentaria se utiliza el método enzimático-gravimétrico AOAC 985.29, en el que se pesa el precipitado después de una digestión con alfa-amilasa, proteasa y amiloglucosidasa (AOAC 1995). La cuantificación de los glúcidos se calcula “por diferencia” mediante el análisis proximal de Weende, después de conocer la humedad, proteína, grasa y fibra cruda. Para la determinación de las cenizas se utiliza una mufla a $600\text{ }^\circ\text{C}$ durante 12 h en la que se calcina la muestra.

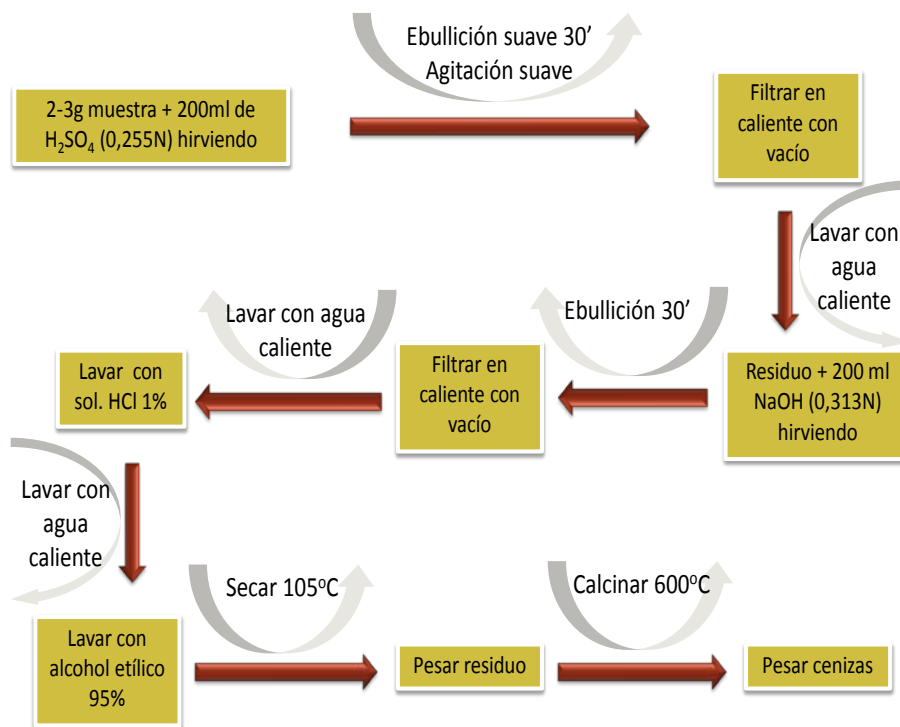


Figura 3.1.- Esquema de la determinación de fibra cruda

3.2.4 Grasa

La grasa se extrae de las muestras en un Soxhlet con éter dietílico durante cinco horas. Una vez eliminado el disolvente, se deseca el extracto etéreo hasta un peso constante, lo que indica su evaporación total. La diferencia de peso del matraz antes y después de la extracción, permite calcular el contenido de grasa.

Los distintos tipos de ácidos grasos se determinan mediante cromatografía de gases, cuantificando sus derivados metil ésteres. Para ello, las muestras se tratan con tolueno, ácido sulfúrico y metanol, esta

mezcla se incubaba en un baño de agua a 50 °C durante 2 horas. A continuación, se añade una solución de NaCl 5 %, y por último, se extraen los ésteres con hexano. La composición de ácidos grasos metil ésteres se determina con un detector de ionización de llama con un programa de temperatura entre 160 y 230 °C, con un gradiente de temperatura de 2 °C por minuto. Los picos fueron comparados con sus correspondientes patrones (Christie 1989).

3.2.5 ***Esteroles***

Generalmente los esteroides se aíslan de la fracción lipídica no saponificable después de su extracción (Wrolstad y cols. 2005). La saponificación de las grasas consiste en una hidrólisis básica o ácida que da como resultado alcohol (glicerol) y ácidos grasos. Dentro de estos lípidos se encuentran triacilglicéridos, fosfolípidos, glucolípidos, esfingolípidos y ceras (O'Keefe 2008). Los lípidos no saponificables incluyen esteroides, alcoholes grasos, vitaminas liposolubles como los carotenos y las vitaminas A, D, E y K, alcoholes grasos y otras sustancias (Holdt y Kraan 2011).

Se emplea el método de saponificación directa descrito por Kovacs y cols. (1979) en el que se utiliza KOH y etanol. Para la extracción de lípidos totales se utiliza el método Folch y cols. (1957), con las modificaciones propuestas por Bligh y Dyer (1959) y Beninger y Lucas (1984), en las que se utiliza una mezcla extractora de cloroformo y metanol (Boulom y cols. 2014).

En la determinación de los esteroides se utiliza el método de cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID) (Boulom y cols. 2014).

3.2.6 ***Proteína***

La cantidad de proteína se valora mediante la determinación del nitrógeno total, por el método de Kjeldahl, por ser el más apropiado y con un alto grado de fiabilidad (coeficiente de variación <1 por ciento) en muestras de alto contenido proteico (AOAC 1995).

El principio básico de este método es la conversión del nitrógeno de las sustancias nitrogenadas en amonio, atacándolas con ácido sulfúrico concentrado. El material orgánico se oxida a dióxido de carbono y agua; el ácido sulfúrico se convierte en dióxido sulfúrico y el nitrógeno se fija en forma de sulfato amónico. La oxidación del material orgánico se acelera añadiendo sulfato potásico para elevar la temperatura y como catalizadores se utilizan cobre y selenio (tabletas Kjeldahl). Posteriormente, la cantidad de sulfato de amonio se determina añadiendo un exceso de hidróxido sódico y sometiendo la mezcla a un proceso de destilación y titulación.

3.2.6.1 **Digestión**

El proceso se realiza en un digestor Büchi B-426. Las muestras exactamente pesadas se depositan en los tubos de digestión, en los que anteriormente se han introducido dos pastillas de catalizador Kjeldahl y cuatro perlitas de vidrio, para evitar retrasos en la ebullición e impedir explosiones suaves del sulfúrico. A continuación, se añaden 20 ml H_2SO_4 concentrado. Se considera finalizada la digestión cuando han transcurrido 15 minutos después de haber cambiado el color de las muestras a verde claro.

3.2.6.2 **Destilación**

Esta fase del proceso se lleva a cabo en una unidad de destilación Büchi B-316. Para prevenir una reacción violenta excesiva durante la fase de neutralización, previamente a la destilación, se diluye

la mezcla digerida con 100 ml H₂O destilada, para ello el tubo de digestión ha de estar frío.

Se neutraliza el ácido y se libera amoníaco a partir del sulfato amónico utilizando 80 ml NaOH 40 %. Se pone en marcha el destilador y se recogen 120 ml de destilado en 100 ml de ácido bórico con un indicador formado por verde de bromocresol y rojo de metilo.

3.2.6.3 **Titulación**

El exceso de amoníaco se valora con HCl 0,1 N de factor conocido, produciéndose cloruro amónico que mantiene el pH elevado. La adición de clorhídrico debe ser lenta y la cantidad necesaria para producir de nuevo un cambio de pH, paso de color verde a rojo, se utiliza para la cuantificación del contenido total de nitrógeno.

3.2.6.4 **Cálculos para la determinación de la proteína**

Los cálculos se basan en el hecho de que un átomo gramo de nitrógeno da lugar a la formación de un mol de amoníaco, que a su vez requiere para neutralizarlo un mol de ácido. Los resultados se multiplican por 6,25 para transformarlos en proteína.

3.2.7 ***Aminoácidos***

La composición aminoacídica de las proteínas de las algas se determina por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC). Se valoran los siguientes aminoácidos: ácido aspártico (ASP), serina (SER), ácido glutámico (GLU), glicina (GLI), histidina (HIS), arginina (ARG), treonina (TRE), alanina (ALA), prolina (PRO), metionina (MET), cisteína (CIS), valina (VAL), lisina (LIS), isoleucina (ILE), leucina (LEU), fenilalanina (FEN), norleucina (NORLEU) y tirosina (TIR).

Las muestras (0,1 g) se colocan en un recipiente con 50 ml de HCl 6 M. El contenido se hidroliza a 110 °C durante 20-24 h, y esta solución se seca en un rotavapor. El residuo se disuelve en HCl 20 mM y finalmente se filtra a través de una membrana de nylon de 0,45 micras de tamaño de poro. El hidrolizado obtenido de esta manera junto con los estándares se derivatizan usando el sistema AccQ Tag para el análisis de aminoácidos (Waters, Milford, MA) (Figura 3.2) y se analizan mediante una modificación del sistema de HPLC de fase inversa. Este sistema HPLC consiste en una bomba de HPLC binario (Waters 1525), un módulo de degasificación (Waters degasificador In-line AF), un inyector automático (Waters 717 plus) y un detector de fluorescencia (Waters 2475) con los parámetros indicados en la Tabla 3.1.

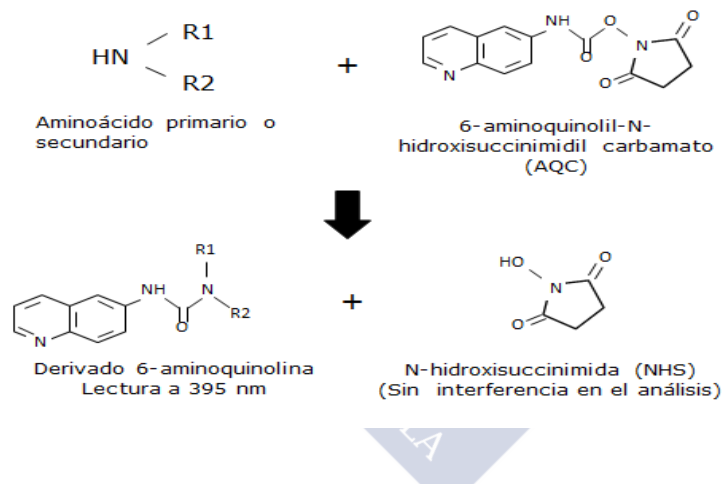


Figura 3.2. Derivatización de los Aminoácidos

Tabla 3.1. Parámetros aplicados en el detector de fluorescencia Waters 470

Longitud de onda de excitación	250 nm
Longitud de onda de emisión	395 nm
Filtro	0,5
Ganancia	8

Los cromatogramas se registran usando el programa de software Breeze, un ejemplo de cromatograma se puede ver en la Figura 3.3. Las soluciones estándar de aminoácidos, excepto norleucina, se obtienen de Waters (estándar de aminoácidos, WAT 088.122). La norleucina se prepara en agua MilliQ de forma individual (Sigma Chemicals Co., EE.UU., ref. N-8513) para proporcionar concentraciones de trabajo de 12, 30, 40, 60, 80, 120 pmol/L. El gradiente se realiza con tampón A (200 ml de eluyente A concentrado, Waters Ref. WAT 05890 y 800 ml de agua MilliQ) y tampón B (600 ml de acetonitrilo grado gradiente, Merk Ref. 1.00030.2500 y 400 ml de agua MilliQ). Para separar los aminoácidos se utiliza una columna de fase inversa (AccQ Tag, 150 mm de largo, 3,9 mm de diámetro). La columna se equilibra con tampón A a un caudal de 1 ml por min a 20 °C durante toda la medición. El gradiente se produce por los cambios de concentración en la fase móvil indicados en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Evolución del gradiente cromatográfico

Minuto	% Fase móvil A	% Fase móvil B	Curva
0.5	6	94	6
19	11	89	6
25	13	87	6
25	13	87	6
36	33	67	10
37	33	67	6
47	100	0	6

Se inyectan diez microlitros de cada una de las muestras mediante un inyector automático, los productos eluidos se miden con un detector de fluorescencia a longitudes de onda de excitación y emisión de 250 y 395 nm, respectivamente (Cohen y Michaud 1993; Cohen y De Antonis 1994).

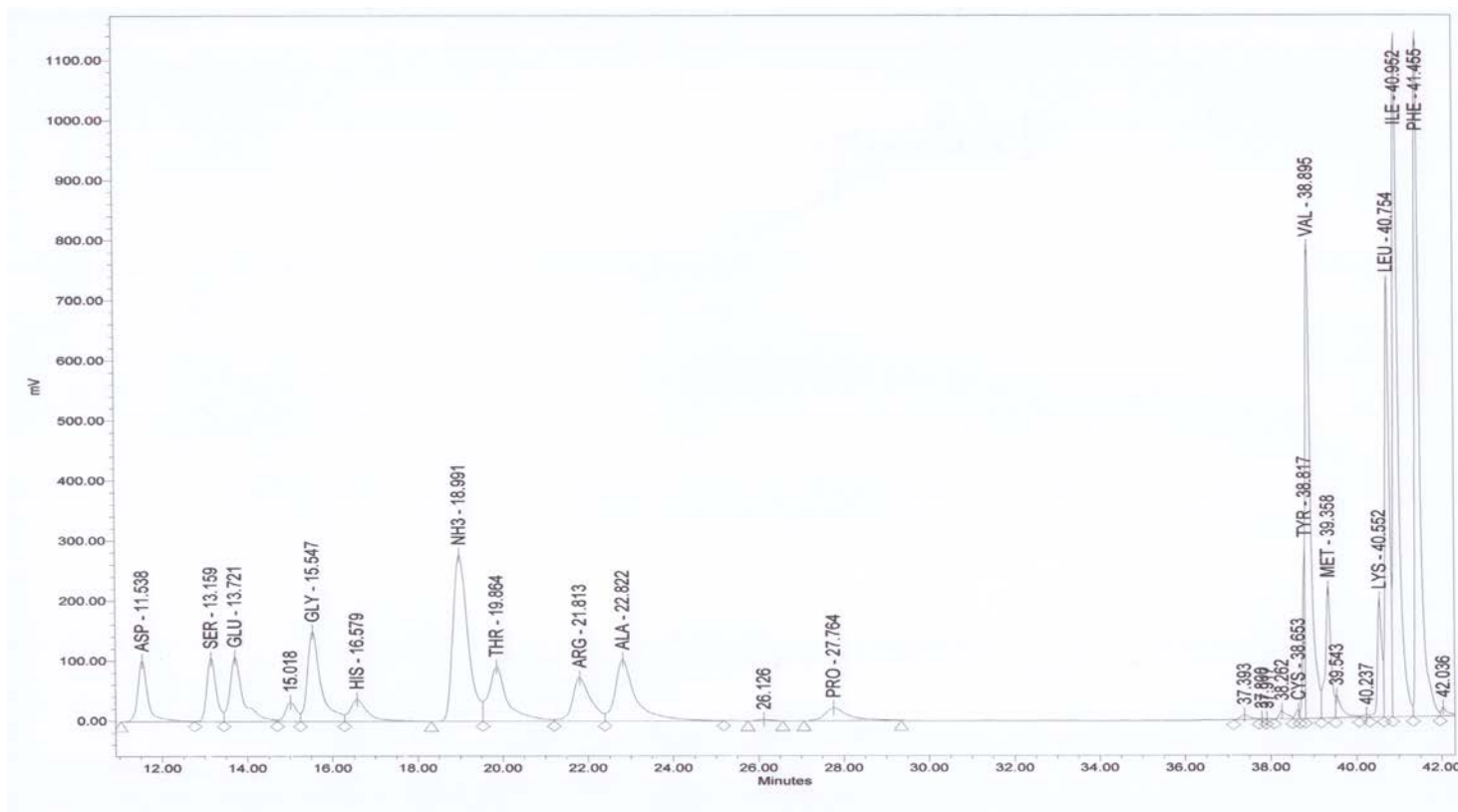


Figura 3.3.-Figura 3.3.- Cromatografía de aminoácidos de Lechuga de mar

3.3 Animales y Dietas de experimentación

Los experimentos se realizan con ratas macho de raza “Sprague–Dawley” con peso comprendido entre 50-120 g. Se asignan 8 individuos a cada grupo y se alimentan durante 28 días con su dieta correspondiente y agua *ad libitum*. Los animales se alojan en jaulas metabólicas transparentes situadas en una habitación que reúne las condiciones ambientales adecuadas de temperatura (22 ± 2 °C), humedad (55 ± 10 %) y fotoperíodo de luz-oscuridad (12h:12h) (Figura 3.4). El procedimiento seguido se ajusta al aceptado por el Comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Compostela y la Consellería do Medio Rural de la Xunta de Galicia número 15007AE/09/FUN 01/FIS. 02.

El estudio del valor nutricional de las algas se lleva a cabo en dos etapas diferentes. En la primera, a animales cuyo peso inicial oscila entre 105 y 120 g, se les incluye en su dieta Lechuga de mar, Wakame o Nori. En la segunda etapa, se completa el estudio anterior, utilizando animales recién destetados, de peso comprendido entre 50 y 70 g, que ingieren dietas que contienen Espagueti de mar o Ramallo de mar.

El grupo control siempre se alimenta con pienso estándar para roedores (SAFE A04, Scientific Animal Food & Engineering, Augy, France). Los ingredientes que forman parte de este pienso son: cebada, trigo, maíz, torta de soja, salvado de trigo, soluble de pescado concentrado, fosfato bicálcico, carbonato de calcio, premezclas de vitaminas y de oligoelementos.



Figura 3.4.- Jaula metabólica

En estas dietas, en las que se utilizan piensos comerciales, el balance energético, así como los nutrientes esenciales, están suficientemente cubiertos, de esta manera se evita que se produzcan anomalías en los animales durante el desarrollo de la experiencia. Los valores medios garantizados de los compuestos que forman parte del pienso estándar se resumen en la Tabla 3.3.

Para la elaboración de los piensos con algas, se sustituye un 10 % del pienso estándar utilizado en la alimentación de los animales control por el mismo porcentaje de cada alga. En el caso de Nori, debido a su alto contenido en proteínas, se utiliza un 85 % de pienso estándar más un 5 % de almidón, de esta forma se logra un equilibrio proteico en todos los piensos.

Tabla 3.3. Composición del pienso estándar

Nutriente	Cantidad
Proteína bruta	16,1 %
Materia grasa	3,1 %
Almidón	45,8 %
Azúcar total	2,0 %
Celulosa bruta	3,9 %
Cenizas brutas (minerales)	5,1 %
Calcio	8400 mg/kg
Fósforo	5700 mg/kg
Sodio	2500 mg/kg
Potasio	6400 mg/kg
Manganeso	70 mg/kg
Cobre	17 mg/kg
Vitamina A	6600 UI/kg
Vitamina B₃	900 UI /kg
Vitamina E	30 mg/kg

3.4 Parámetros nutritivos

Para evaluar la calidad nutritiva de la proteína procedente de las dietas que contienen algas, se sigue la técnica de Thomas Mitchell (1924) basada en el balance nitrogenado en ratas en período de crecimiento, en la que se miden las tasas de nitrógeno que ingieren y las que se excretan en heces y orina (Figura 3.5).

En esta técnica se controla la alimentación y las deposiciones de los animales durante 16 días, que se dividen en dos períodos:

Después de 3 días de aclimatación de los animales a las condiciones de luz/oscuridad, temperatura y humedad del animalario, comienza el **período endógeno** en el que el alimento que ingieren son harinas preparadas con un 4 % de proteína. Esta alimentación no permite un crecimiento del animal pero asegura un balance de nitrógeno nulo, y de esta forma se conoce la cantidad de nitrógeno metabólico fecal y de nitrógeno endógeno que se elimina en la orina. El origen de este nitrógeno son secreciones que se vierten a la luz intestinal, descamaciones procedentes de epitelios orgánicos, enzimas, urea excretada, aminoácidos y albúmina sérica (Muñoz-Calvo y del Pino-Martínez 1982). Este período dura seis días, tres de adaptación a la nueva dieta y tres de recogida de excretas.

Una vez acabado el período endógeno comienza el **período principal** en el que el contenido proteico es de un 16 %, cantidad suficiente para permitir una retención adecuada de nitrógeno. Comienza con 3 días de adaptación seguidos de otros 7 en los que se determina la cantidad de nitrógeno ingerido y se recogen excretas para cuantificar el nitrógeno eliminado por heces y orina. Para la determinación del nitrógeno se utiliza el método de Kjeldahl, descrito anteriormente, después de la deshidratación y pulverización de las heces y la dilución de la orina con H_2SO_4 1 %.

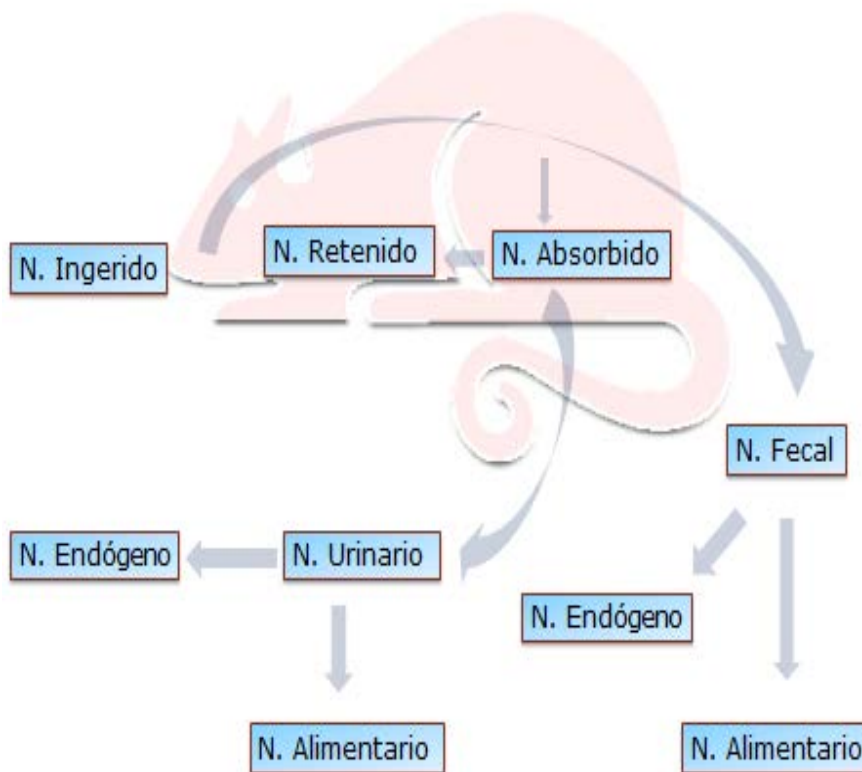


Figura 3.5.-Esquema del balance de nitrógeno

A cada uno de los animales, alojados en jaulas metabólicas individuales, se le suministra diariamente 10 g de alimento y se pesa el resto del día anterior. El aumento de peso corporal se determina pesando las ratas antes de empezar cada período experimental y una vez finalizados éstos, previo ayuno de 12 horas en ambos casos (Bender y Bender 1997; Macarulla y Portillo 1998).

3.4.1 ***Determinación del valor nutritivo de las proteínas***

3.4.1.1 **Métodos químicos**

En primer lugar, mediante HPLC se obtiene el perfil aminoacídico de las proteínas objeto de estudio y se compara con una proteína de referencia “ideal” de valor biológico conocido (caseína). Posteriormente, se calculan el Índice Químico, el Índice de Mitchell, el Índice de Proteínas, el Índice de Aminoácidos y el Índice de Aminoácidos corregido.

El **Índice Químico** fue propuesto por Mitchell y Block (1946), y se basa en expresar el valor de cada aminoácido esencial de la proteína test como porcentaje del contenido del mismo aminoácido en una proteína patrón (proteína de huevo, caseína,...), tomada como referencia para asegurar un crecimiento óptimo en ratas (Hegedus 1989). A partir de estos resultados se puede indicar el aminoácido limitante, como aquel en que es más deficiente la proteína problema con respecto a la proteína patrón. Este índice se basa en relaciones estrictamente numéricas de composición de aminoácidos, por lo tanto, únicamente indica el aminoácido esencial limitante y no tiene en cuenta la disponibilidad de ese aminoácido. Por otra parte, el Índice Químico muestra una baja correlación con el valor biológico determinado en animales (Hansen y Eggum 1973).

$$IQ = \frac{\text{mg del aminoácido en la proteína test/g de proteína}}{\text{mg del aminoácido en la proteína patrón/g de proteína}} \times 100$$

El **Índice de Mitchell**, establecido por Mitchell (1954), es una modificación del Índice de Oser. En este índice se calcula la media geométrica de los valores de cada aminoácido esencial de la proteína test, respecto a su valor correspondiente con la proteína patrón (Hernández y cols. 1996). Se omite el aminoácido arginina por no ser esencial, y se calcula como si fuese un solo aminoácido la suma de, por un lado la metionina y la cisteína, y por otro, la fenilalanina y la tirosina. Esto se debe a la dependencia biosintética que tienen los segundos con respecto a los primeros. Para realizar su cálculo, se considera que una cantidad superior en aminoácidos de la muestra, con respecto a la de la proteína patrón, es irrelevante, de esta forma, las relaciones superiores a uno se consideran como la unidad.

$$IM = \frac{\text{media geométrica de los valores de cada aminoácido esencial de la proteína test}}{\text{media geométrica de los valores de cada aminoácido esencial de la proteína patrón}}$$

El **Índice de Proteínas** lo propone un grupo de expertos de la FAO en 1957. Debido a que uno de los principales problemas de los índices químicos es la elección de la proteína de referencia, estableció un patrón de proteína teórico, calculado en base a los requerimientos de aminoácidos en humanos. En dicho patrón los niveles de aminoácidos azufrados son menores que en la proteína de huevo utilizada mayoritariamente como referencia, por lo que se obtenía una mejor correlación con la determinación biológica (Pellett 1978).

$$IP = \frac{\text{media geométrica de los valores de cada aminoácido esencial de la proteína test}}{\text{media geométrica de los valores de cada aminoácido esencial requerido en humanos}}$$

Índice de Aminoácidos: El comité de expertos de la FAO/OMS en 1973 sugiere un nuevo patrón de proteína, basado en la evaluación de requerimientos de aminoácidos en humanos. Este índice relaciona cada uno de los aminoácidos esenciales con el valor requerido de los mismos en el hombre.

$$IAA = \frac{\text{aminoácido esencial}}{\text{requerimiento en humanos del aminoácido esencial}}$$

El **Índice de Aminoácidos Corregido** constituye el método más adecuado para evaluar la calidad proteica (Pellett 1978). Se calcula como el producto de la digestibilidad verdadera por el índice del aminoácido más deficitario.

3.4.1.2 Métodos biológicos

Para evaluar la calidad nutritiva de las proteínas procedentes de las harinas que contienen algas con respecto al pienso estándar, se calculan una serie de índices nutritivos biológicos a partir de los datos obtenidos de las tasas de nitrógeno que se ingieren y se excretan (Figura 3.6).

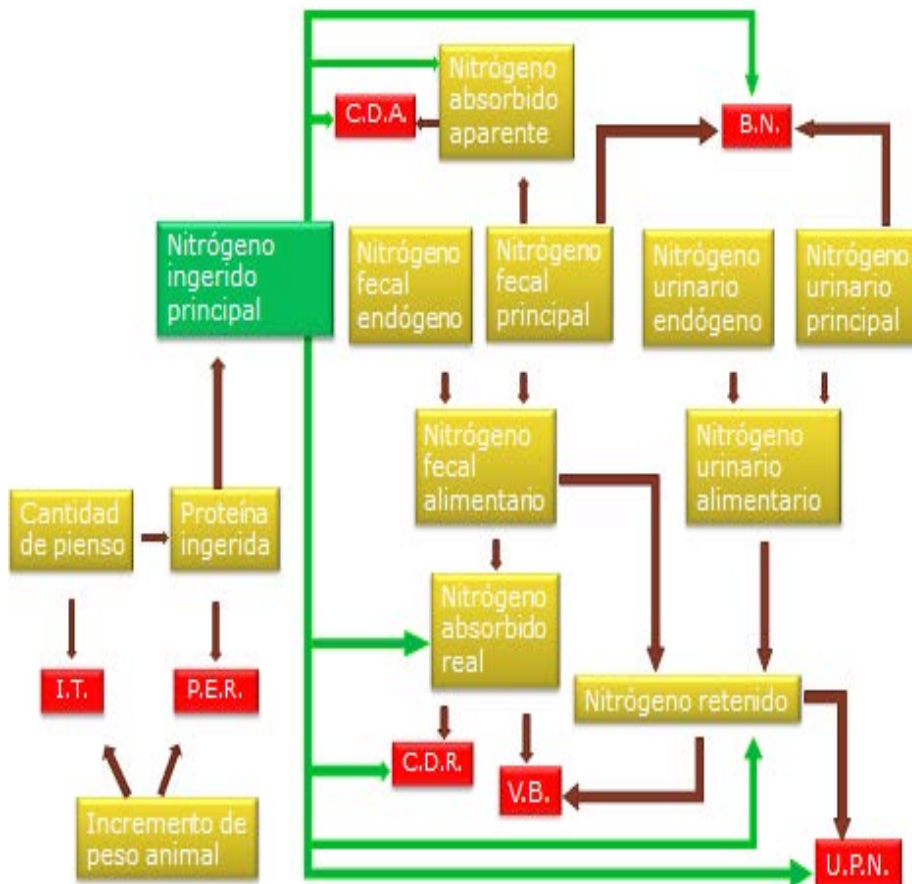


Figura 3.6.- Relaciones entre parámetros nutritivos

Valor Biológico (VB). Fue definido por Thomas (1909) y modificado por Mitchell (1924) para tener en cuenta la pérdida de nitrógeno de origen endógeno. Este índice se determina midiendo la cantidad de nitrógeno ingerido en la dieta así como la eliminada por heces y orina. El nitrógeno urinario es el que proviene del metabolismo de los aminoácidos que se absorben, mientras que el fecal procede de la

suma del material nitrogenado de la dieta que no se absorbe y el que tiene su origen en la descamación del tejido intestinal y enzimas digestivas.

El VB es el porcentaje de nitrógeno retenido en función del total absorbido. Este dato proporciona información de en qué medida la proteína ingerida cubre los requerimientos de aminoácidos esenciales. La deficiencia de cualquiera de estos aminoácidos impide la correcta síntesis de proteínas, lo que provoca una inadecuada retención de nitrógeno. Cuando el VB es superior al 70 % se considera que la proteína cubre la demanda de nitrógeno durante el período de crecimiento, siempre que la energía que aporte la dieta sea la adecuada.

Digestibilidad. Se define como la proporción de nitrógeno ingerido que se absorbe (Bressani 1977). Se puede diferenciar el Coeficiente de Digestibilidad Aparente (CDA) del Coeficiente de Digestibilidad Real (CDR), en el primero no se tiene en cuenta el nitrógeno endógeno de heces que se determina utilizando una dieta con bajo contenido proteico (4 %). El CDR puede oscilar entre el 74-80 por ciento en proteínas vegetales hasta 97 por ciento de las proteínas de la carne y el huevo (Santidrián 1988).

Balance Nitrogenado (BN). Es la diferencia entre el nitrógeno ingerido y el eliminado, en gramos por día. Un equilibrio nitrogenado o un BN positivo con una ingesta de nitrógeno superior a la pérdida por vías de excreción son imprescindibles en periodos de crecimiento como pueden ser la infancia, adolescencia o embarazo. Un BN negativo provoca la degeneración o pérdida de tejidos (Santidrián 1988).

Utilización Proteica Neta (UPN). Este parámetro indica la cantidad de proteína que realmente utiliza el organismo, es decir, la proporción de proteína de la dieta que es retenida por el cuerpo. La UPN incluye el Valor Biológico y la Digestibilidad, de esta forma se tienen en cuenta las pérdidas endógenas fecales y urinarias de nitrógeno (Miller y Bender 1955; Hernández y cols. 1996).

Coefficiente de Eficacia Proteica (PER). El coeficiente de eficacia proteica, que relaciona el incremento del peso corporal con la cantidad de proteína ingerida (Osborne y cols. 1919), indica en qué medida la proteína ingerida es adecuada para cubrir las necesidades proteicas de los individuos en crecimiento.

$$\text{PER} = \frac{\text{Incremento de peso corporal (g)}}{\text{Proteína ingerida (g)}}$$

Índice de Transformación del Alimento (IT). El índice de transformación del alimento relaciona la cantidad de alimento ingerido con la ganancia de peso (Barber y cols. 1953).

$$\text{IT} = \frac{\text{Cantidad de pienso consumido (g)}}{\text{Ganancia de peso total (g)}}$$

3.5 Determinación de parámetros hemáticos

Una vez finalizado el periodo en el que se recogen las muestras para el estudio nutricional (16 días), se continúa alimentando a los animales con la misma dieta utilizada en el período principal durante 14 días más. Finalizado este tiempo, se mantienen las ratas en ayunas

durante 12 horas. A continuación, se sacrifica al animal y se realiza un corte en la yugular para su desangrado. La sangre se recoge en tubos para su centrifugación a 1.000 g durante diez minutos; en el suero sanguíneo así obtenido, se analizan los siguientes parámetros: colesterol-total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, triglicéridos, nitrógeno ureico, proteína total, albúmina, glutámico oxalacético transaminasa, glutámico pirúvico transaminasa y glucosa.

Para estas determinaciones se utiliza un autoanalizador Spotchem, modelo SP-4410 (Menarini). Es un sistema automático de análisis bioquímicos que emplea la técnica de química seca.

3.6 Obtención de las muestras de tejidos

Después de sacrificar el animal y proceder a su desangrado, se realiza una laparotomía y se extrae el intestino delgado, se lava con suero fisiológico frío hasta dejarlo completamente libre de contenido intestinal, se abre longitudinalmente, se raspa la mucosa intestinal con una espátula y se pesa.

Así mismo, se extraen hígado, riñones y corazón, se introducen en suero fisiológico frío para lavarlos, se pesan, se trituran y se separan en alícuotas de 1 gramo del total para proceder a las determinaciones enzimáticas correspondientes.

3.7 Determinación de la proteína en tejidos

El método elegido para la cuantificación de la proteína de los homogeneizados ha sido el de Lowry y *cols.* (1951), se utiliza una curva patrón de seroalbúmina bovina a concentraciones entre 120 y 600 microgramos/ml. El color final desarrollado se debe a dos reacciones: la primera a causa del complejo formado por la proteína con el cobre en medio álcali, la segunda es una reacción de reducción del agente fosfomolibdico-fosfotúngstico por la tirosina y el triptófano presentes en la proteína.

La lectura de la reacción colorimétrica se realiza en un espectrofotómetro Beckman Du-50 a 750nm.

3.8 Determinaciones enzimáticas

3.8.1 *Disacaridasas*

Para la valoración de las actividades de las enzimas **maltasa** (α - glucosidasa, EC 3.2.1.20), **sacarasa** (β - fluctofuranosidasa, EC 3.2.1.48) y **lactasa** (β - galactosidasa, EC 3.2.1.23) se mide la liberación de la glucosa después de la hidrólisis de los respectivos disacáridos utilizando el reactivo TGO (glucosa - oxidasa, peroxidasa y o - dianisidina) (Dahlqvist 1968; Miller 1981) (Figura 3.6).

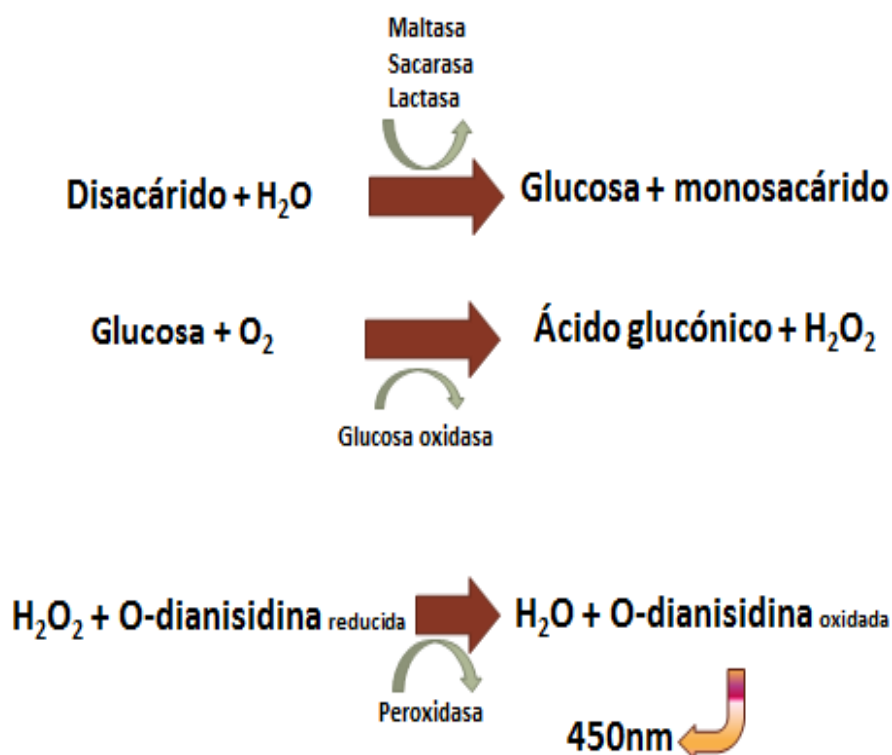


Figura 3.6.- Reacciones para la determinación de disacaridasas

La mucosa intestinal se procesa según el método de Kessler y cols. (1978). Para ello, se homogeniza la muestra en Tris-HCl-manitol 50 mM (pH=7,1) en una proporción 1:10, mediante un potter ultraturrax T25 a 11.000 rpm, a 4 °C; a continuación, se añade MgCl₂ 10 mM, se esperan 10 minutos manteniendo los homogeneizados en frío con agitación esporádica, se centrifuga en frío a 4.200 g durante 10 minutos y el sobrenadante obtenido se congela en alícuotas a -80 °C hasta su procesamiento (Figura 3.7).

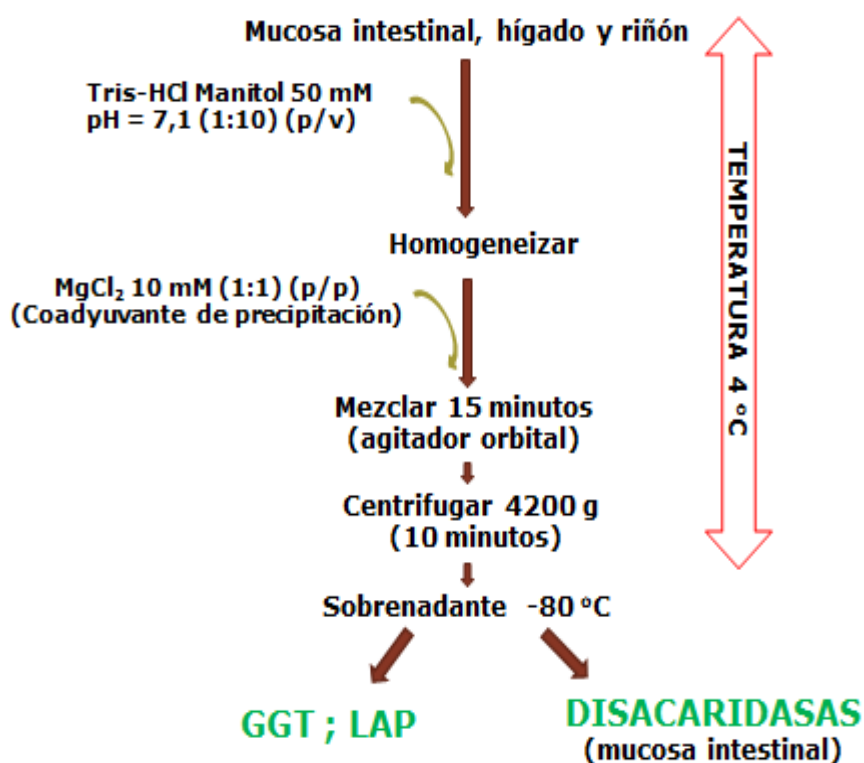


Figura 3.7.- Preparación de tejido para disacaridasas, GGT y LAP

Para la determinación de las disacaridasas, se coge 0,1 ml del disacárido correspondiente diluido en tampón maleato (0,1 M a pH=6), se le añade la muestra y se mantiene en un baño con agitación a 37 °C, a continuación se vuelve a incubar después de completar la reacción con TGO, lo que permite la inhibición de la reacción enzimática debido al cambio de pH y a la dilución de la muestra. La glucosa liberada reacciona con la glucosa oxidasa, liberando una molécula de peróxido de hidrógeno que a su vez reacciona con la ortodianisidina (cromógeno) y, con la mediación de la peroxidasa, se puede determinar colorimétricamente el compuesto resultante (Figura 3.8).

Al reactivo TGO se le añade un detergente no iónico, Triton X-100, para controlar el enturbiamiento y se utiliza como disolvente

Tampón Tris-HCl 0,5 M pH=7, para el control efectivo de la actividad de las glucosidasas.

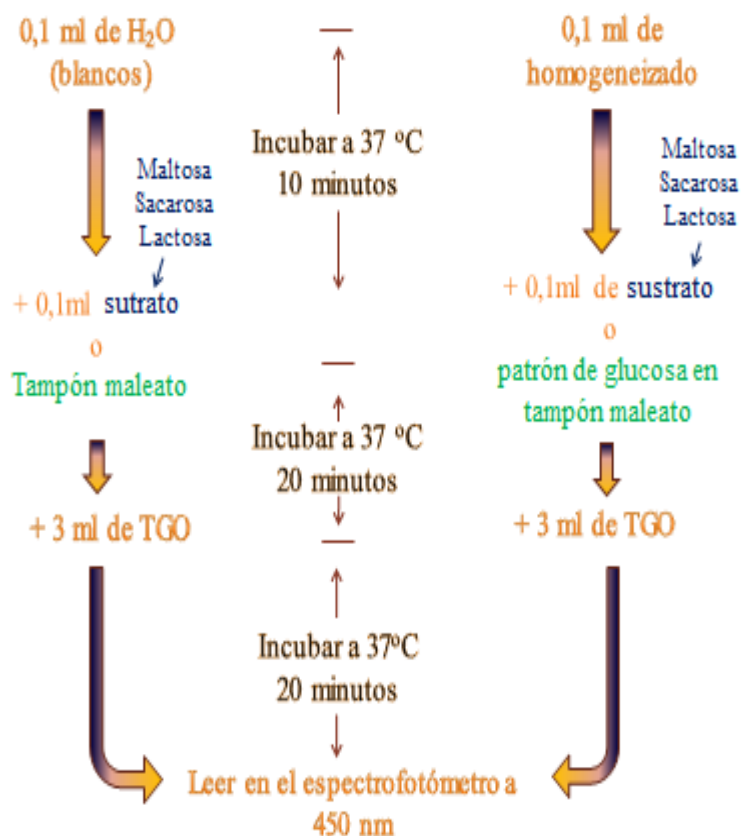


Figura 3.8.- Protocolo en la determinación de disacaridasas

La mucosa intestinal de algunos animales, entre los que se encuentra la rata, tienen un inhibidor que disminuye el color desarrollado por la glucosa con el reactivo TGO (Asp y cols. 1967; Asp y cols. 1969). Por este motivo, se añade al protocolo un patrón de glucosa al que se le incorpora el homogeneizado que incluye de forma

intrínseca el inhibidor. De esta forma se puede comparar la densidad óptica obtenida en el patrón con las de las muestras.

El blanco se obtiene utilizando agua destilada en lugar de la muestra de homogeneizado.

La actividad enzimática por g de proteína de muestra se calcula utilizando la fórmula propuesta por Dahlqvist (1968).

$$\text{Actividad enzimática (UI/g de proteína)} = \frac{10 * a * d}{180 * 60 * n * g \text{ proteína}}$$

UI = μ moles de glucosa liberada/minuto

10 = para expresarlo en ml (se recogen 0,1 ml de homogeneizado)

a = microgramos de glucosa liberada en 60 minutos

$$a = \frac{\text{Absorbancia} * 18 (\mu\text{g de patrón}) * 60 (\text{minutos})}{\text{Absorbancia inhibidor (patrón)} * 20 \text{ minutos}}$$

d = factor de dilución

180 = peso molecular de la glucosa

60 = para expresar los resultados por cada minuto

n = número de moléculas de glucosa por cada disacárido (2 para la maltosa y 1 para sacarosa y lactosa)

g proteína = gramos de proteína por cada mililitro de homogeneizado.

3.8.2 *Leucino aminopeptidasa (EC 3.4.11.1)*

La actividad de LAP se determina siguiendo el método de Goldberg y Rutenburg (1958) que se basa en valorar la cantidad de β -naftilamina liberada en la hidrólisis de la L-leucil β -naftilamida hidrocloreto, que es el sustrato de la reacción (Figura 3.9).

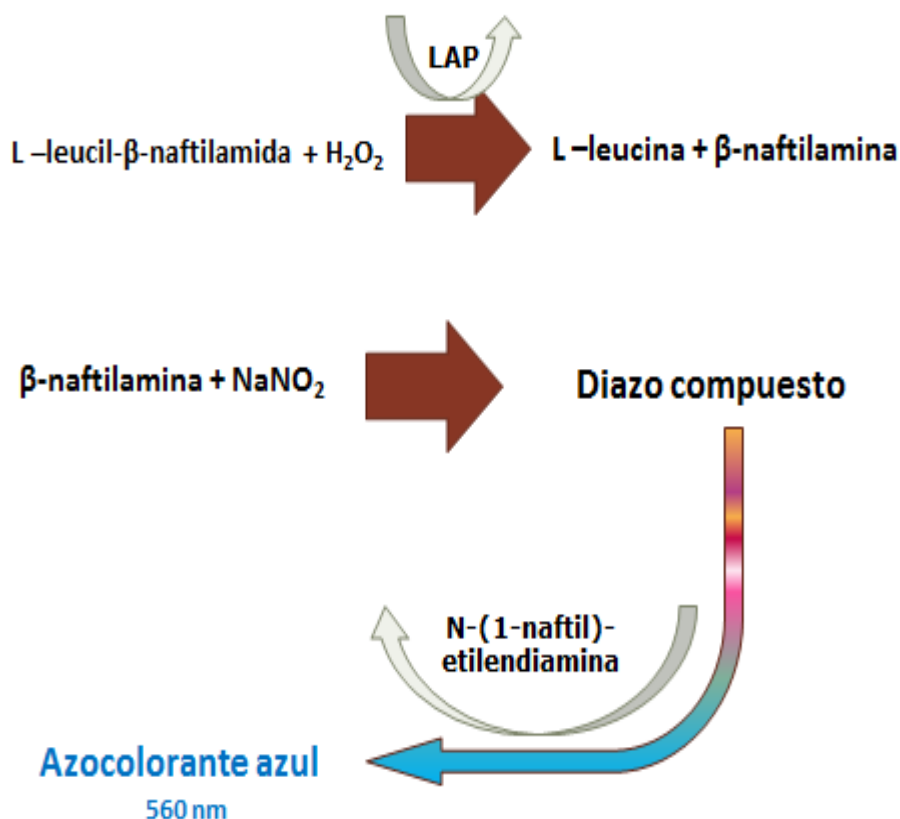


Figura 3.9.- Reacciones en la determinación de leucino aminopeptidasa

Las muestras de riñón, hígado y mucosa intestinal se homogeneizan, en frío, en Tris-HCl-manitol 50 mM (pH=7,1) en una proporción 1:10, mediante un potter ultraturrax T25 a 16.000 rpm, 13.000 rpm y 11.000 rpm, respectivamente.

A continuación, se mezcla la muestra de tejido homogeneizado con una solución de L-leucil- β -naftilamida hidrocloreto 1,37 mM y tampón fosfato 0,2 M (pH=7,0). La reacción se frena con ácido tricloroacético al 40 % y posteriormente se le adiciona nitrito sódico al 0,1 % para provocar el proceso de diazotación. El exceso de nitrito sódico se descompone al añadirle una solución de sulfamato amónico 0,5 %. Finalmente, se adiciona N-(1-naftil)-etilendiamina dihidrocloreto 0,05 % en etanol 95 %, que tiñe la betanaftilamina diazotada en un azocolorante azul, cuya coloración se cuantificará en el espectrofotómetro (Figura 3.10)

Como blanco de la reacción se utiliza agua destilada en lugar de muestra y se procesa con un protocolo similar. Los resultados se comparan con los de una recta patrón realizada a partir de una solución madre de β -naftilamina de 1,8 mg/dl en tampón fosfato. La actividad de la leucino aminopeptidasa se expresa en nanomoles de betanaftilamida/g de proteína/minuto.

3.8.1 *Gamma glutamil transpeptidasa (EC*

2.3.2.2)

La actividad de esta enzima se determina siguiendo el método de Meister y cols. (1981), que se basa en que la GGT cataliza la transferencia del radical gammaglutamil del gammaglutamil-p-nitroanilida al péptido glicilglicina. La p-nitroanilina generada reacciona con nitrito sódico y con N-naftietilendiamina dando un

compuesto coloreado púrpura que se cuantifica en el espectrofotómetro (Figura 3.11).

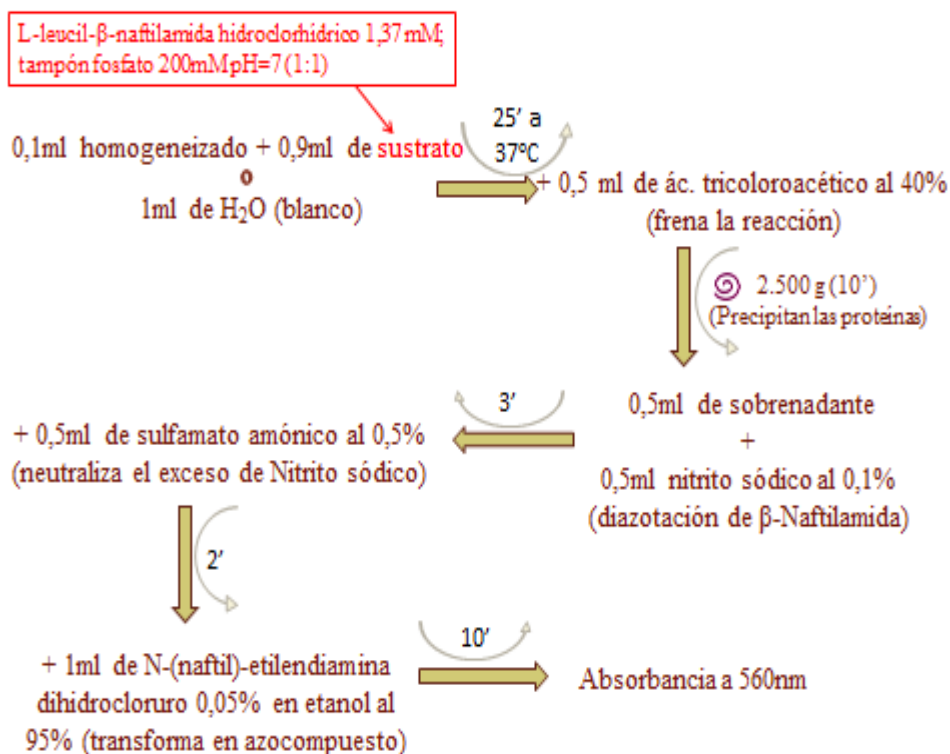


Figura 3.10.- Protocolo para la determinación de la actividad de la enzima leucino aminopeptidasa

Las muestras de riñón, hígado y mucosa intestinal se homogeneizan, a 4 °C, en Tris-HCl-manitol 50 mM (pH = 7,1) en una proporción 1:10, mediante un potter ultraturrax T25 a 16.000 rpm, 13.000 rpm y 11.000 rpm, respectivamente.

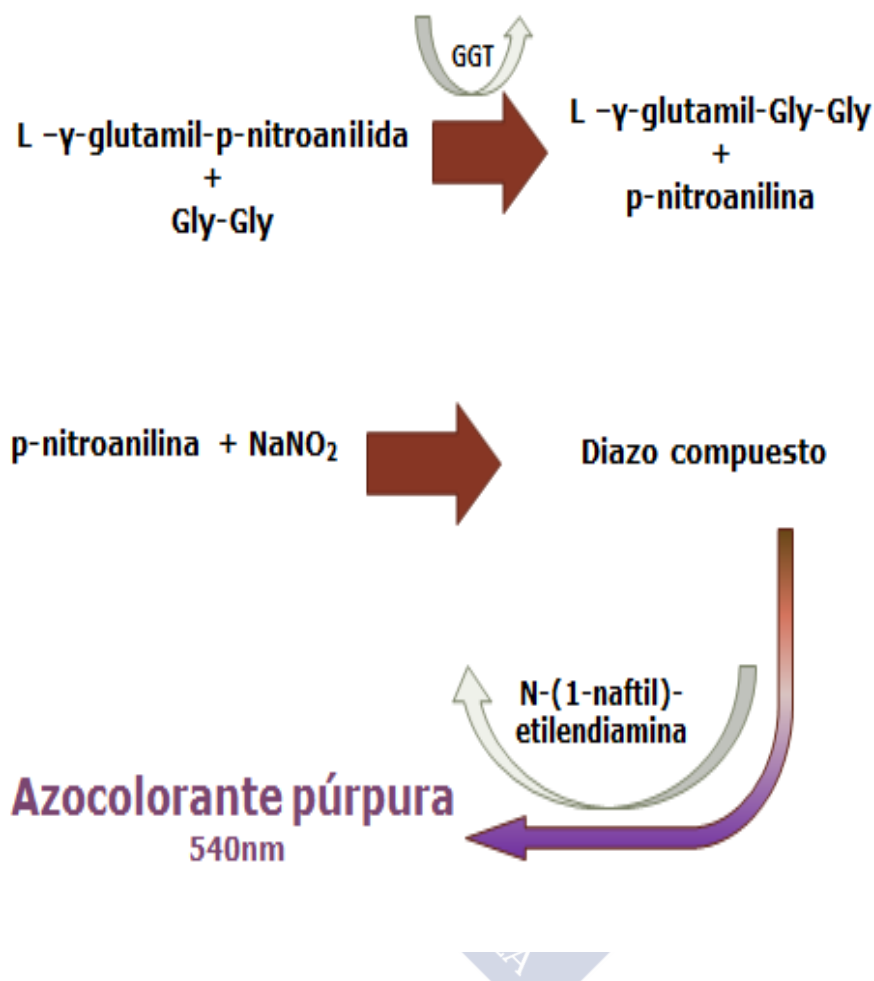


Figura 3.11.- Reacciones en la determinación de gama-glutamyl transpeptidasa

La muestra de tejido homogeneizado se mezcla con un sustrato elaborado mezclando L- γ -glutamyl-p-nitroanilida 5 mM, glicilglicina 0,1 M y tampón tris-HCl 0,1 M (pH = 8,0), en proporción 1:1:3. A continuación, se le añade ácido tricloroacético al 10 % que paraliza la hidrólisis enzimática y nitrito sódico al 0,1 % que es un intermediario necesario para que actúe la sustancia cromógena. Posteriormente, se adiciona sulfamato amónico al 1 % que es necesario para descomponer

el exceso de nitrito sódico y para finalizar, N-naftiletilendiamina dihidrocloruro 0,05 % en agua, para teñir el compuesto final resultante de la reacción cuya coloración depende de la cantidad de p-nitroanilina que se produzca (Figura 3.12).

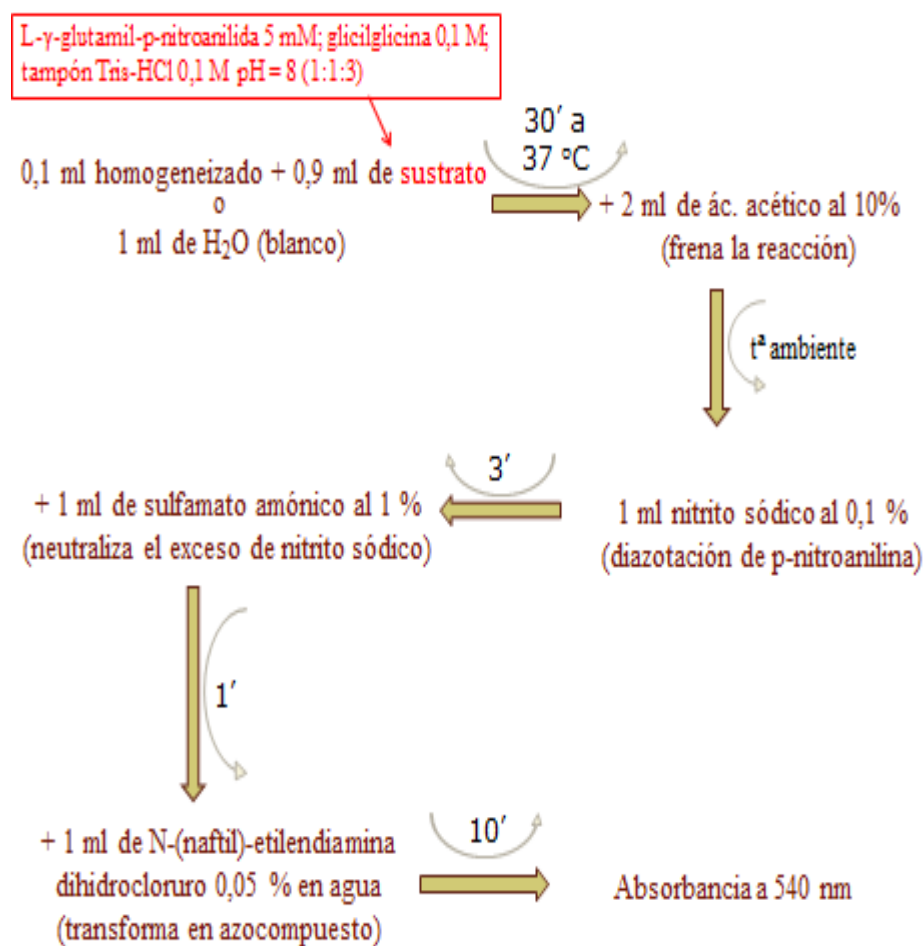


Figura 3.12.- Determinación de la actividad de la gamma glutamil transpeptidasa

Como blanco de la reacción se utiliza agua destilada en lugar de muestra y se procesa con un protocolo similar. Los resultados se comparan con los de una recta patrón realizada a partir de una disolución de p-nitroanilina 0,138 g/l. La actividad de la gammaglutamil transpeptidasa se expresa en nanomoles de paranitroanilina/g de proteína/minuto.

3.9 Determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

El método más rápido y sencillo para cuantificar esta peroxidación es mediante la determinación colorimétrica de las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esta técnica mide un cromógeno formado con el ácido tiobarbitúrico (TBA) y el malondialdehído (MDA) (Esterbauer y Cheeseman 1990).

La muestra de tejido se homogeneiza en NaCl 0,9 % (pH=7,2), se centrifuga y se recoge el sobrenadante (Figura 3.13).

Posteriormente a 0,5 ml de homogeneizado se le añade 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % para desnaturalizar las proteínas y se centrifuga a 13.000 g durante 5 minutos. A 0,5 ml del sobrenadante se le añaden 0,025 ml de butil hidroxitolueno (BHT) al 1 % (p/v en ácido acético glaciar) para evitar la posible oxidación lipídica que conlleva un incremento indeseable del MDA final. A continuación se mezclan 0,2 ml de laurilsulfato sódico al 8 % (p/v), 1 ml de ácido acético al 20 % (p/v) a pH=3,5 y 1 ml de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) al 0,8 % (p/v) a pH=3,5. Esta mezcla se calienta a 95 °C durante 30 minutos, así reaccionará una molécula de MDA, resultante de la oxidación lipídica, con dos moléculas de TBA. Una vez finalizado el tiempo establecido, se frena el proceso en frío.

A continuación se añaden 3 ml de n-butanol como fase orgánica y se mezcla por inversión durante 4 minutos. Se centrifuga a 1.000 g durante 10 minutos para diferenciar la fase acuosa de la orgánica, y es en esta última donde se mide la absorbancia a 535 nm (Figura 3.14).

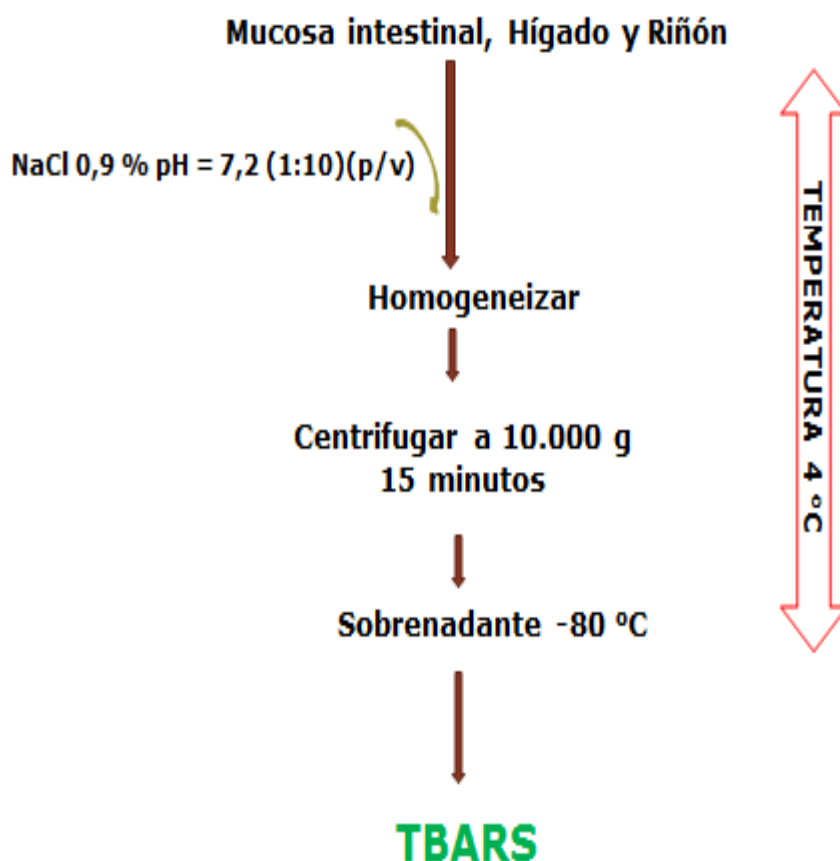


Figura 3.13.- Preparación de tejido para TBARS

0,5 ml de homogeneizado en NaCl 0,9 % pH = 7,2 (1:10)

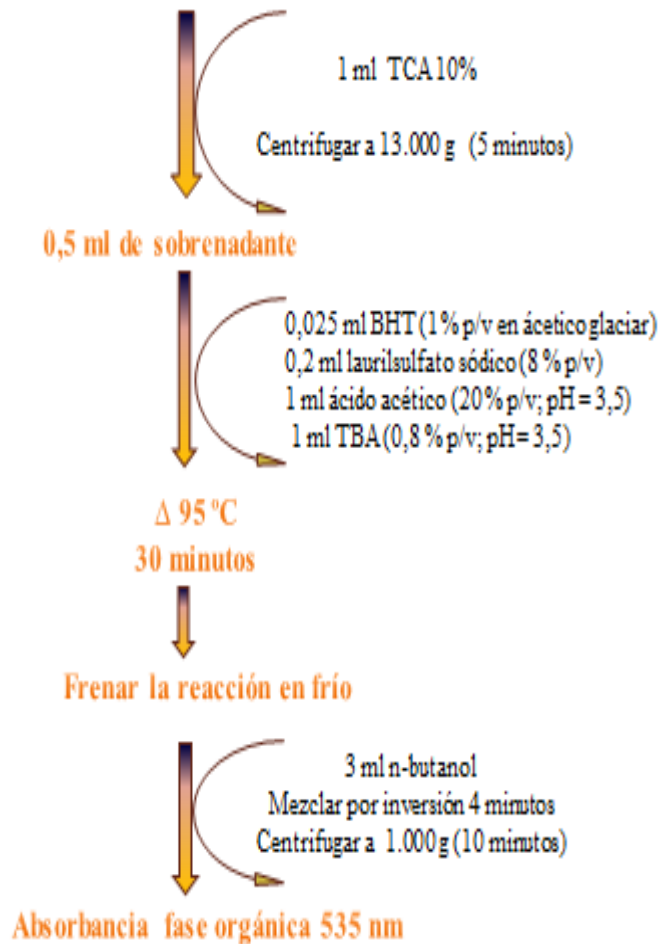


Figura 3.14.- Protocolo en la determinación de TBARS

Para el cálculo de la concentración de MDA se utiliza una recta patrón que se realiza con concentraciones de 3, 6, 12, 24 y 36 nanomoles/ml, partiendo de una solución madre de 0,04 ml de MDA (1,1,3,3-Tetraetoxipropano, 97 %, Sigma T9889-25 ml) en 100 ml de ácido sulfúrico al 1 % y utilizando como blanco agua destilada.

3.10 Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes

La determinación de enzimas antioxidantes se lleva a cabo de acuerdo con la técnica de Mahfouz y Kummerow (2000). Para ello, se homogeneiza, mediante un potter ultraturrax T-25, 1 g de muestra de tejido (hígado, riñón, corazón y mucosa intestinal) en sacarosa 0,25 M en la proporción 1:4 (p/v).

A continuación, 3 ml de la muestra homogeneizada se ultracentrífuga a 100.000 g durante sesenta minutos. En la fracción sobrenadante se determina la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. Al resto del homogeneizado de hígado, riñón y corazón se le añade 1 ml de colato de sodio 0,25 % y se centrifuga a 700 g durante diez minutos. En el sobrenadante obtenido se valora la actividad de la catalasa (Figura 3.15).

Durante todo el proceso se mantiene una temperatura en torno a 4 °C con el fin de evitar la posible degradación enzimática.

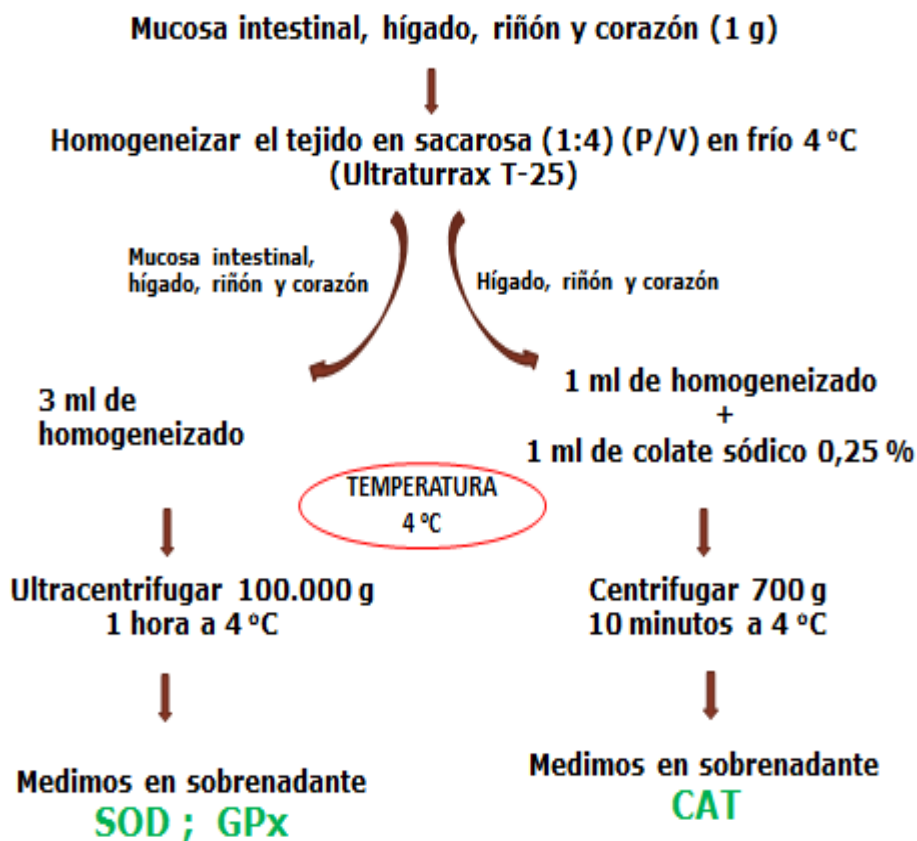


Figura 3.15.- Preparación de la muestra de tejido para la determinación de enzimas antioxidantes

3.10.1 *Superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1)*

Para determinar la actividad superóxido dismutasa (SOD) se utiliza el kit RANSOD (Laboratorios RANDOX) que se basa en el método desarrollado por Beauchamp y Fridovich (1971).

Este método emplea como generador de radicales superóxido la reacción de la xantina con xantina oxidasa, estos radicales reaccionan con 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio (INT) para dar un compuesto rojo denominado formazán, cuyo color se valora espectrofotométricamente. La inhibición de esta última reacción, debido al secuestro de los radicales superóxido que son utilizados como sustrato por la SOD, es indicativa de su actividad enzimática (Figura 3.16).

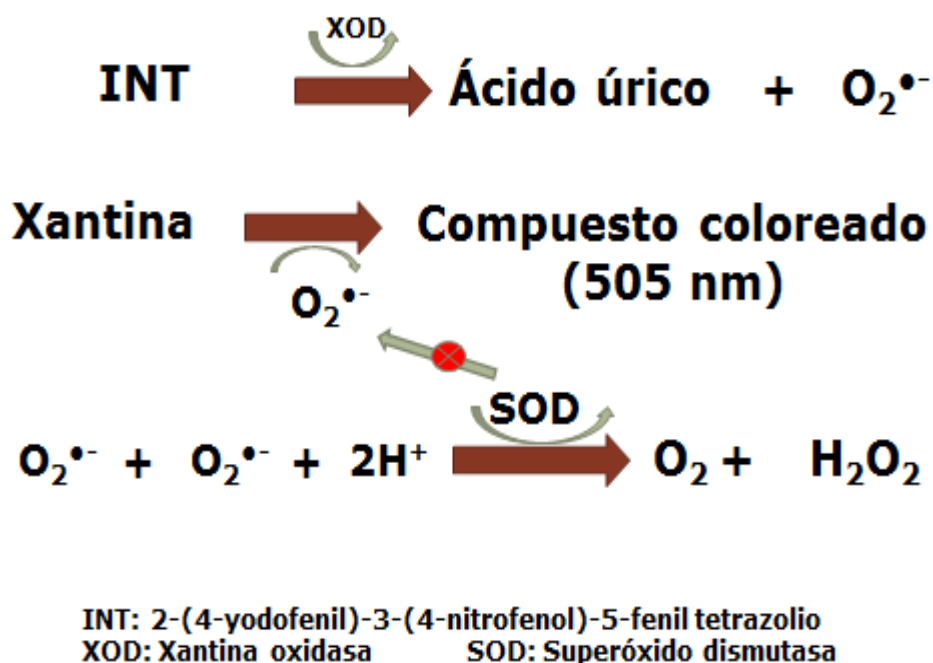


Figura 3.16.- Reacciones en la determinación de SOD

La SOD inhibe la formación del formazán rojo y su actividad se mide como porcentaje de inhibición comparándolo con una curva de calibración preparada con SOD purificada contenida en el kit.

La muestra se diluye con tampón fosfato 10 mM (pH=7,0). A 0,05 ml de la muestra diluida se le añaden 1,7 ml de sustrato (xantina 0,05 M + INT 0,025 mM en tampón CAPS conteniendo EDTA 0,94 mM (pH=10,2) y 0,25 ml de xantina oxidasa (80 U/L), se incuba a 37 °C y la absorbancia se mide a 505 nm frente al aire a los 30 y 210 segundos después de la adición de la enzima. Paralelamente se procesa un blanco que se corresponde con el 100 % de inhibición.

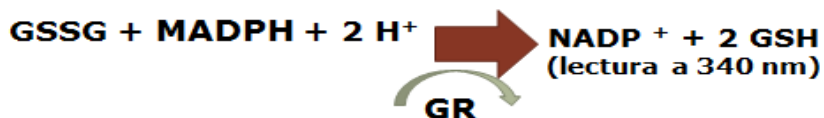
La actividad de la SOD se expresa en U/mg de proteína. Siendo la unidad de SOD la cantidad de enzima que inhibe el 50 % de la tasa de formación del formazán rojo. El ensayo es lineal desde el 30 al 60 % de inhibición.

3.10.2 *Glutación peroxidasa (EC 1.11.1.9)*

Para medir la actividad de la glutación peroxidasa (GPx) se utiliza el kit RANSEL (Laboratorios RANDOX) que se basa en el método desarrollado por Paglia y Valentine (1967).

El fundamento del método radica en una reacción colorimétrica, originada por la transformación del glutación (GSH) a su forma oxidada (GSSG) por el hidroperóxido de cumeno (ROOH), que tiene como catalizador a la glutación peroxidasa. En presencia de glutación reductasa (GR) y NADPH, el glutación oxidado se convierte a la forma reducida con una oxidación, en paralelo, del NADPH a NADP⁺. El consumo de NADPH se mide espectrofotométricamente a 340 nm a 37 °C.

Para llevar a cabo las reacciones, a 0,02 ml de muestra se le añade 1 ml de la solución que contiene glutación 4 mM, glutación reductasa 0,5 U/L, NADPH 0,34 mM, tampón fosfato 0,05 M (pH=7,2) y EDTA 4,3 mmol/l. A continuación se le adicionan 0,04 ml de hidróxido de cumeno 4,86 mM, se incuba a 37 °C y se mide la absorbancia a 340 nm frente a aire durante 3 minutos. Paralelamente se procesa un blanco en el que se sustituyen los 0,02 ml de muestra por tampón fosfato 0,05 M.



ROOH: hidroperóxido de cumeno

Si el cambio de absorbancia por minuto excede de 0,1 hay que diluir la muestra y multiplicar el resultado por el factor de dilución. Los datos de la actividad de la GPx obtenidos utilizando la ecuación de Lambert Beer se expresan en nanomoles de NADPH consumidos/minuto/mg de proteína.

$$\text{Actividad enzimática GPx} = \frac{\Delta A/\text{min} \cdot V_t \cdot 10^9 \cdot D}{\epsilon \cdot V_m \cdot L \cdot P}$$

$\Delta A/\text{min}$ = Incremento de absorbancia por minuto.

V_t = Volumen total de la mezcla de reacción.

10^9 = Factor de conversión de mol a nanomoles.

ϵ = Coeficiente de extinción para el NADPH a 340 nm
($6,3 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

V_m = Volumen de la muestra.

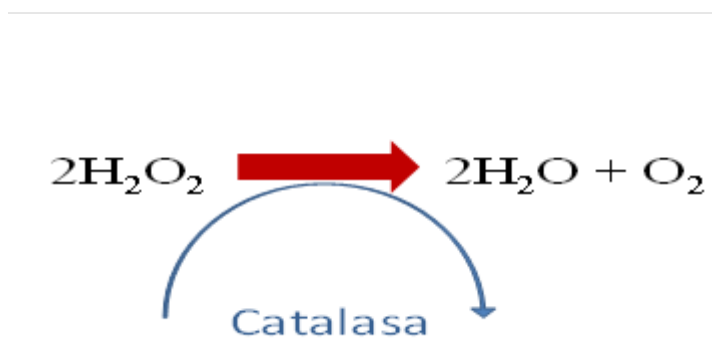
L = Longitud de paso de luz por la cubeta.

P = Miligramos de proteína por litro.

D = Factor de dilución.

3.10.3 *Catalasa (EC 1.11.1.6)*

La actividad de la catalasa (CAT) se cuantifica utilizando el kit CAT100 de Sigma siguiendo el método de Aebi (1984) que se basa en la descomposición, a lo largo del tiempo, del peróxido de hidrógeno debido a la acción de la catalasa, de acuerdo con la reacción:



La reacción enzimática se detiene con azida sódica, que inhibe a la catalasa, al cabo de 3 minutos en el caso del riñón y de 1 minuto para el hígado y corazón. De esta manera se cumple la recomendación de disminución de la concentración inicial de H_2O_2 del 30 al 50 % en 1-5 minutos.

Este procedimiento utiliza el ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenceno-sulfónico asociado oxidativamente con 4-amino-antipirina, que en presencia de peróxido de hidrógeno y peroxidasa dan una quinona-imina roja (N-(4-antipiril)-3-cloro-5-sulfonato-p-benzoquinona-monoimina) que absorbe la luz a 520 nm. La concentración de peróxido de hidrógeno usada en este ensayo (50 mM) se puede medir espectrofotométricamente, pero no es una concentración suficiente para causar la inactivación de la enzima. En una alícuota de la mezcla de reacción se mide colorimétricamente el H_2O_2 residual y la actividad de la catalasa se expresa como micromoles de H_2O_2 descompuestos/minuto/mg de proteína (Figura 3.17).

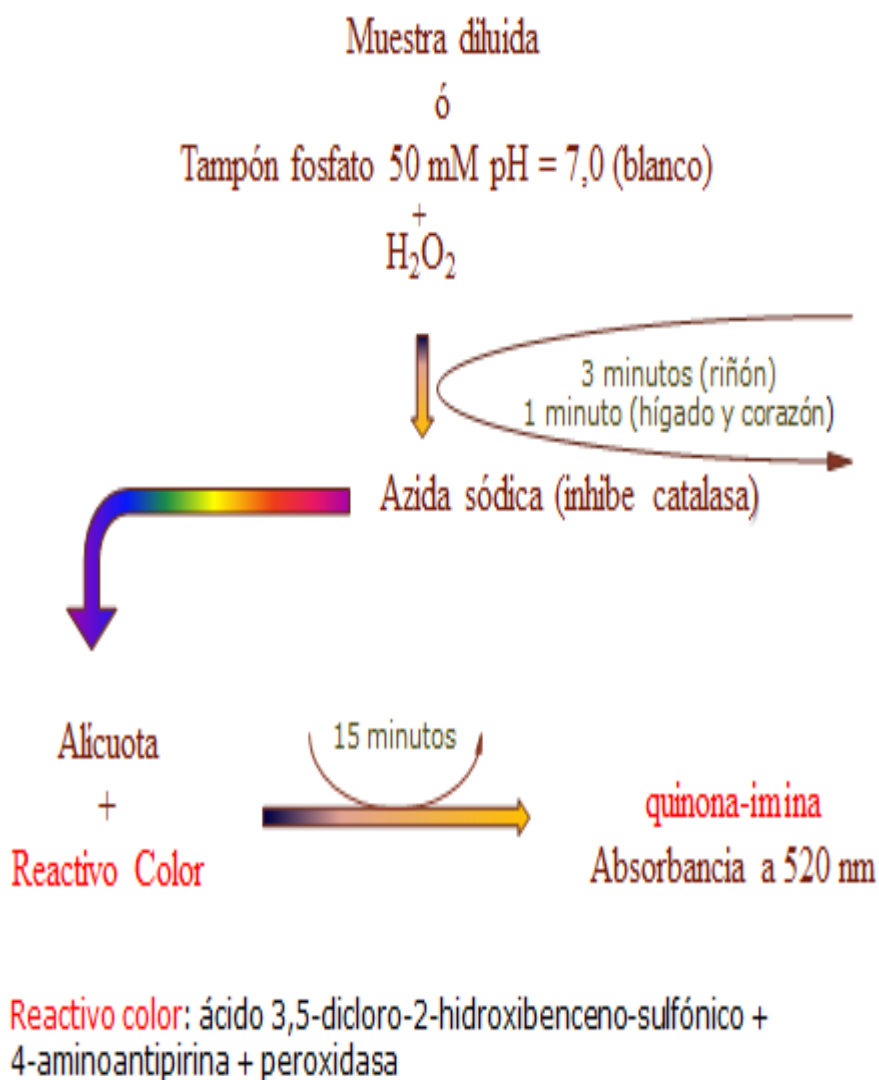


Figura 3.17.- Determinación de la catalasa

3.11 Análisis estadístico de los resultados

Los resultados correspondientes a cada grupo se expresan como la media \pm error estándar de la media.

Para el análisis estadístico de los datos se utiliza el programa IBM SPSS statistics 19.

Con el objetivo de averiguar en qué medida las modificaciones obtenidas en este trabajo puedan ser consideradas como válidas para el conjunto de la población, se realiza un estudio estadístico de Análisis de la Varianza para un factor (ANOVA).

A todas las muestras se les aplica el test de normalidad Kolmogorov-Smirnov, que da como resultado que todos grupos tienen una distribución normal. Después de comprobar la homogeneidad de varianzas (prueba de Levene), elegimos las pruebas adecuadas según el resultado arrojado. Si queremos detectar diferencias significativas de las medias, para muestras con varianzas iguales se utilizan los test estadísticos de Welch y de Tukey, si las varianzas son diferentes, los test elegidos fueron Brown-Forsythe y Games-Howell, considerándose diferencias significativas si los valores de probabilidad son menores de 0,05.

A la hora de analizar los resultados se han desestimado los valores atípicos (*outliers*). Estos datos son aquellos que por circunstancias, ya sean del método o de mala práctica, se sitúan muy alejados de la media, provocando la distorsión del resultado final. De esta forma, los valores superiores e inferiores a la media ± 3 veces la desviación típica, fueron eliminados del tratamiento estadístico.





RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4 Resultados y discusión

4.1 Composición de las harinas

Para poder elaborar las dietas, previamente se analiza el contenido de humedad, grasa y proteína de las algas objeto de estudio. Las muestras son suministradas en polvo y secas, la humedad en todas ellas está situada en torno al 10 %. Los resultados junto con los de fibra, cenizas y glúcidos, se muestran en tanto por ciento en peso seco (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Composición de las algas (% en peso seco)

Alga	Proteína	Grasa	Fibra bruta	Fibra dietética	Cenizas	Glúcidos
Lechuga de mar	17,84	0,89	11,87	40,8	28,6	42,60
Wakame	16,81	2,80	14,90	30,7	28,3	37,19
Nori	33,18	1,00	7,46	22,9	21,3	37,06
Ramallo de mar	19,44	2,84	3,20	35,0	30,4	44,12
Espagueti de mar	14,61	4,41	4,14	36,1	37,1	39,74

4.1.1.1 Glúcidos

Los resultados obtenidos indican que en todas las algas analizadas los glúcidos son los componentes mayoritarios, y dentro de éstos, la fibra dietética es preponderante. Esto es una característica general en la mayoría de las macroalgas (MacArtain y cols. 2007).

En general, se recomienda que los glúcidos, preferentemente de bajo índice glucémico, supongan entre un 55 y un 60% del consumo energético total (Mann y cols. 2007) y para una función intestinal normal, el consumo diario de fibra dietética en adultos debería estar entre 25 y 30 g (14 g/1.000 Kcal) procedente de diversos alimentos y no de suplementos (Gray 2006). En concreto en España por término medio se considera que existe un déficit de consumo de fibra dietética de 10 g al día/persona y en especial la fracción insoluble es en la que la deficiencia es mayor (Ruiz-Roso 2013).

El alga Ramallo de mar, con un 44 %, es la que mayor porcentaje de glúcidos tiene de todas las algas analizadas, sin embargo el contenido más elevado en fibra dietética corresponde a Lechuga de mar con un 40,8 %. Además se puede apreciar que Nori es la que presenta el menor porcentaje de fibra dietética (22,9 %) con respecto al resto de algas, resultado que coincide con Cofrades y cols. (2010) cuando comparan Wakame, Nori y Espagueti de mar. El estudio llevado a cabo por Pádua y cols. (2004) para el género *Ulva* (Lechuga de mar) pone de manifiesto variaciones de fibra dietética del 46,5 al 72,28 % en función del lugar y de la época del año. Plaza y cols. (2008) y Rodrigues y cols. (2015), entre otros, obtuvieron valores similares a los de este estudio.

La fibra disminuye el tiempo del tránsito intestinal y tiene efectos hipocolesterolémicos y de prevención de diabetes tipo II (Cáceres y cols. 2004; Slavin 2013). El contenido de fibra de las algas podría ser una característica importante a la hora de llevar a cabo su incorporación a las dietas occidentales, que generalmente presentan un contenido elevado en productos refinados pobres en fibra, de tal forma que la ingesta de fibra es, en general, insuficiente para tener una buena

salud. Por ello, el consumo de algas podría ser una buena opción para alcanzar los valores diarios aconsejados por la OMS.

4.1.1.2 Grasa y ácidos grasos

En general, las algas tienen un contenido de grasa bajo, que en este estudio se encuentra en valores que van desde los 0,9 y 1 % en materia seca de Lechuga de mar y Nori, respectivamente, hasta los 4,4 % de Espagueti de mar. Los valores intermedios fueron de 2,8 % para Wakame y Ramallo de mar.

Las proporciones de ácidos grasos con respecto a la grasa total analizados en estas algas se muestran en la Figura 4.1. Como se puede observar, los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados se corresponden aproximadamente con el 25 y el 30 % del total, respectivamente, lo que supone que más de la mitad del total de ácidos grasos no son saturados. Estos porcentajes de los diferentes ácidos grasos concuerdan con los datos mencionados por otros autores (Sánchez-Machado y cols. 2004a; Ortiz y cols. 2006; Ortiz y cols. 2009; Cofrades y cols. 2010). Además, Espagueti de mar es el alga que más grasa contiene, pero también es la que tiene mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados (37,53 %) y monoinsaturados (30,2 %).

El elevado contenido en ácidos grasos insaturados de las algas hace que su consumo pueda contribuir a incrementar la ingesta de este tipo de grasa y de esta manera acercarse a una nutrición más equilibrada con una proporción de ácidos grasos saturados:monoinsaturados:poliinsaturados de 25:60:15.

La cantidad de ácidos grasos poliinsaturados es similar a la de otros vegetales terrestres (Matanjan y cols. 2008). La proporción entre los ácidos grasos ω -6 y ω -3 varía no sólo de unas algas a otras, sino también dentro de la misma alga si las condiciones ambientales son diferentes, de modo que incluso puede que la cantidad de ω -6 sea superior a la de ω -3 en determinadas circunstancias pero inferior si éstas cambian (Dawczynski y cols. 2007). En nuestro caso, otro punto a favor de la composición lipídica de estas algas es la relación entre los

ácidos grasos ω -3 y ω -6, dado que hay entre 2 y 7 veces más ω -3 que ω -6. Aunque las recomendaciones son que la relación entre los ácidos grasos ω -3 y ω -6 sea de alrededor de 1:5 (Urrialde de Andrés 2003), en España, habitualmente la dieta es deficitaria en ω -3 (Mataix 2004).

De estos datos se puede deducir que el bajo contenido lipídico y la distribución de los diferentes tipos de ácidos grasos de las algas, hace que puedan encajar dentro de una dieta saludable.

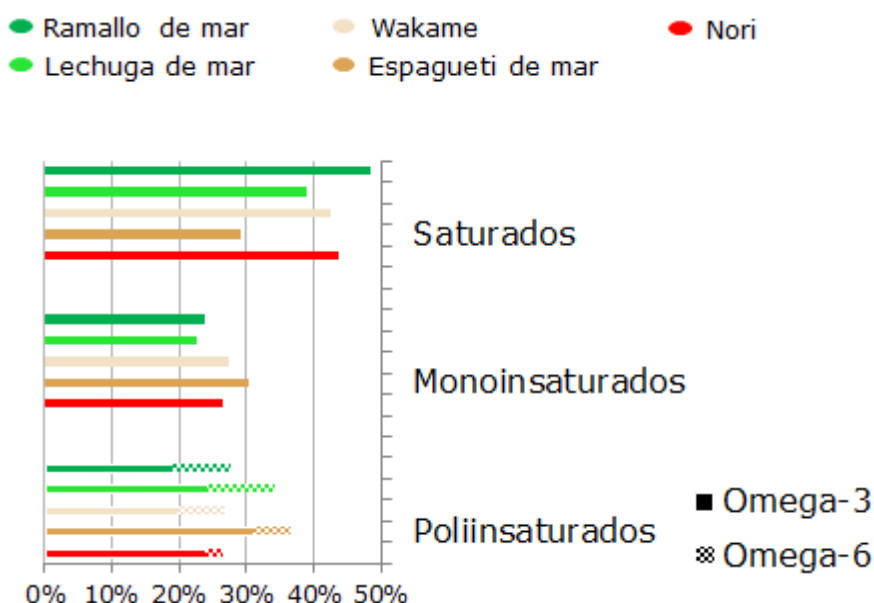


Figura 4.1.-Proporción de ácidos grasos en las algas

4.1.1.3 Esteroles

Los esteroles de la dieta reducen la absorción de colesterol a nivel intestinal y aunque su consumo podría disminuir los niveles en

suero sanguíneo de alfa-caroteno, beta-caroteno y licopeno, siempre se sitúan dentro de niveles considerados normales (Ikeda y cols. 1988; Plat y Mensink 2005). El consumo de 2 g/día de esteroides reduce los niveles de LDL en sangre en un 10 %, por lo que su ingesta prolongada es probable que reduzca el riesgo de enfermedad coronaria entre un 12% y un 20% en los primeros 5 años y en un 20 % a lo largo de toda la vida (Katan y cols. 2003).

El pienso estándar utilizado como base para la elaboración de los piensos tiene más esteroides que las algas incorporadas a los piensos, concretamente 2, 4 y 5 veces más que Lechuga de mar, Nori y Wakame, respectivamente (Tabla 4.2). La lechuga de mar es el alga que más esteroides totales tiene de las 3 algas analizadas, con 333 mg/kg en peso seco, pero se quedaría por debajo del contenido en esteroides de algunos vegetales terrestres (ej. tomate 1167 mg/kg y brócoli 3408 mg/kg) (Piironen y cols. 2003).

Tabla 4.2. Esteroides totales en el pienso estándar, Lechuga de mar, Wakame y Nori (mg/kg peso seco)

	Control	Lechuga de mar	Wakame	Nori
Esteroides totales	697	333	136	178

Los diferentes tipos de esteroides que contienen los piensos se pueden ver en la Tabla 4.3. Aunque el aporte de esteroides de las algas a los piensos no es importante desde el punto de vista cuantitativo, añaden diferentes tipos que el pienso estándar no posee, como es el caso del fucosterol en Wakame y Lechuga de mar o el desmosterol en

Nori, datos que coinciden con los encontrados en la bibliografía (Sánchez-Machado y cols. 2004b).

**Tabla 4.3.- Composición en los diferentes tipos de esteroides
(% de esteroides totales)**

	Control	Lechuga de mar	Wakame	Nori
Colesterol	16,15	16,24	16,02	24,18
Campesterol	17,27	-	-	-
Stigmasterol	4,61	-	-	-
β Sitosterol	49,96	-	6,76	-
D-5-avenasterol	11,98	79,14	-	-
Fucosterol	-	4,63	77,22	-
Desmosterol	-	-	-	75,82

4.1.1.4 Vitaminas

El elevado contenido en vitaminas es otra característica de las algas, sobre todo en vitamina A y en las vitaminas antioxidantes E y C. Los resultados de este estudio muestran que Nori destaca sobre las demás por su riqueza en vitamina A y B₁₂, aunque también hay que resaltar los valores de las vitaminas C y B₆. La Lechuga de mar presenta el mayor contenido en vitamina B₁ y la segunda en vitamina E, después de Espagueti de mar, y en vitamina C, después de Nori. Por último, la vitamina B₆ es especialmente abundante en Wakame (Tabla 4.4). Datos similares son los mencionados por Mabeau y cols. (1992), MacArtain y cols. (2007) y Bocanegra y cols. (2009).

Una de las consecuencias más frecuentes de las dietas vegetarianas es el riesgo de deficiencia de vitamina B₁₂ y por tanto de anemia perniciosa. Existe controversia acerca del aprovechamiento de la vitamina B₁₂ de las algas, especialmente abundante en Nori, como factor antianémico en el consumidor. Así, Dagnelie y cols. (1991) en estudios realizados con Nori y con *Spirulina*, concluyen que las algas producen análogos no cobalamínicos de la vitamina B₁₂ que no son aprovechables en humanos, por lo que la biodisponibilidad de esta vitamina cuando la fuente son algas es cuestionable. Por el contrario, Rauma y cols. (1995) señalan que el consumo de altas cantidades de *Chlorella* o de Nori, al margen de otros efectos adversos que puedan derivar de dosis excesivas, se refleja en niveles séricos de vitamina B₁₂ muy superiores a los de los individuos del grupo control, lo que indicaría que ambas algas aportan un suplemento disponible de vitamina B₁₂, extremo del que se podría deducir la conveniencia de la inclusión de algas en la dieta de vegetarianos.

Tabla 4.4. Contenido en Vitaminas de las algas (mg/kg p.s.).

	Lechuga de mar	Wakame	Nori	Espagueti de mar
Vitamina A (Retinol)	9,58	4,73	23,83	6,69
Vitamina E (α -Tocoferol)	19,7	6,3	9,3	27,1
Vitamina C (Ác. Ascorbico)	94,2	31,0	97,3	61,9
Vitamina B₅ (Ac. Pantoténico)	1,7	2,0	2,7	2,0
Vitamina B₆ (Piridoxina)	< 0,1	1,5	0,9	< 0,1
Vitamina B₂ (Riboflavina)	2,0	0,7	1,89	0,5
Vitamina B₁ (Tiamina)	4,7	0,3	0,4	4,1
Vitamina B₁₂ (Cobalamina)	0,60	0,16	2,90	0,04
Vitamina B₉ (Ác. fólico)	1,08	0,79	< 0,02	1,09
Vitamina B₈ (Biotina)	0,12	0,22	0,10	0,17

4.1.1.5 Minerales

Los minerales, al igual que las vitaminas, no tienen una función energética en sí mismos, pero sí están implicados en las reacciones químicas que tienen lugar en la obtención de energía. Participan en el metabolismo de glúcidos, proteínas y grasas, o bien forman parte de vitaminas, hormonas, células sanguíneas, enzimas, etc. Muchos también intervienen a nivel estructural formando parte de huesos, dientes, etc.

De los elementos minerales analizados que se muestran en la Tabla 4.5 cabe destacar las cantidades de sodio y potasio, macrominerales muy abundantes junto con calcio, magnesio, yodo y fósforo en comparación con los vegetales terrestres (Bocanegra y cols. 2009; Paiva y cols. 2014). Asimismo es importante la presencia de microminerales como hierro, zinc y manganeso. Estos resultados son similares a los observados por Cofrades y cols. (2010) y Paiva y cols. (2014).

Tabla 4.5.- Contenido mineral de las algas (mg/kg)

	Lechuga de mar	Wakame	Nori	Ramallo de mar	Espagueti de mar
Calcio	5245	6932	3592	13262	6558
Potasio	15610	56790	16020	7775	80490
Sodio	15950	35110	7282	11350	33720
Magnesio	20940	6302	2339	20275	7323
Hierro	283	79	105	445	41
Zinc	7	39	33	26	21
Iodo	9	96	5	-	92
Manganeso	16	7	25	47	-
Fósforo	9	47	32	-	23
Cobre	5	2	6	-	2

Los altos niveles de potasio, observados en las algas estudiadas, podrían desempeñar un efecto beneficioso en el organismo ya que se ha demostrado que elevadas dosis de potasio ejercen un efecto protector contra la hipertensión y otros desórdenes cardiovasculares (Preuss y Clouatre 2003). De hecho, a pesar de ser también muy ricas en sodio la relación sodio/potasio es muy baja en la mayoría de las algas estudiadas (1,02 en Lechuga de mar; 0,62 en Wakame; 0,46 en Nori; 1,46 en Ramallo de mar y 0,42 en Espagueti de mar), lo que reduce la retención de fluidos y el incremento de la presión sanguínea sin riesgo de alterar el balance del potasio. Además, se ha demostrado que la fibra de las algas podría retener sodio y ser así excretado con las heces (Ruperez y Saura-Calixto 2001). Por lo tanto, parece que el consumo de algas podría resultar beneficioso en el control de la presión sanguínea (Houston 2014).

El hierro es esencial en la nutrición humana y el mineral que con mayor frecuencia es deficitario en todos los grupos de población, culturas y condiciones socioeconómicas. El alto contenido en hierro de las algas, acompañado de una buena biodisponibilidad, podría ayudar a mejorar esta deficiencia tan extendida (García-Casal y cols. 2007; García-Casal y cols. 2009).

En general, las algas son ricas en calcio, con mayor presencia en las verdes y pardas en comparación con las rojas. En concreto, Wakame, Espagueti de mar, Lechuga de mar y Ramallo de mar contienen entre cinco y once veces más calcio que la leche, por lo que su consumo podría suponer una muy buena fuente de este mineral. Aunque hay que tener en cuenta que en los derivados lácteos, la presencia en ellos de lactosa y de algunos aminoácidos favorece su absorción intestinal.

En las algas también se detecta una elevada presencia de magnesio, especialmente en las pardas y verdes. Concretamente, es en estas últimas donde el porcentaje de magnesio es mayor, hasta diez veces superior a la del alga roja y tres más elevada que en las algas pardas. El magnesio, que contribuye a mantener el potencial eléctrico de las células excitables, es necesario para la síntesis de sustancias

proteicas, interviene en el control del latido cardíaco y su carencia puede conllevar un incremento de la presión sanguínea. Además, es un importante regulador del nivel de calcio en sangre, de tal manera que la hipomagnesemia es una de las causas de hipocalcemia (Torres y Cannata 2003). Por lo tanto, es importante mantener un cierto balance entre magnesio y calcio, los cuales son especialmente abundantes en las algas objeto de estudio, sobre todo en las verdes y pardas.

Las algas han sido descritas como una importante fuente de iodo (Küpper 2015), elemento esencial en la regulación metabólica y el crecimiento. Aunque el consumo excesivo de iodo puede tener efectos tóxicos, esos niveles son difíciles de alcanzar en una alimentación equilibrada.

En general los minerales son más abundantes en las algas que en las plantas terrestres (Ito y Hori 1989; Ortega-Calvo y cols. 1993), por lo que diez gramos de alga pueden cubrir hasta un 40 % de las necesidades diarias de minerales dependiendo del mineral y del alga considerada (Rodrigues y cols. 2015). Este alto contenido mineral propio de las algas ya se ve reflejado en los resultados del porcentaje en cenizas mostrado en la Tabla 4.1.

Aunque las algas son ricas en una amplia variedad de minerales, también lo son en fibra dietética y en proteínas resistentes a la hidrólisis, que pueden pasar a través del intestino sin ser digeridos y absorbidos, lo que puede causar un descenso en la biodisponibilidad de los minerales al formar una barrera física o constituir quelatos o complejos que dificulten su absorción (Holland y cols. 1991). Por lo tanto, parece que la ingestión de algunas algas como Wakame y Nori podrían influir en la biodisponibilidad de los minerales (Urbano y Goñi 2002).

4.1.1.6 Proteínas

La mayoría de las algas pardas tienen menos proteínas que las verdes o rojas, pero, como ya se indicó anteriormente, la composición proteica varía, para una misma alga, según las condiciones ambientales

(İrkin y Erduğan 2014). En nuestro caso, los resultados obtenidos están dentro del rango encontrado por otros autores para estos géneros (Mabeau y Fleurence 1993; Sánchez-Machado y cols. 2004a; Bocanegra y cols. 2009; Pereira 2011; Paiva y cols. 2012). De todas las algas analizadas Nori es la que presenta la mayor cantidad de proteína, con un 33,18 % en peso seco, valor similar al de ciertos vegetales terrestres como puede ser la soja, utilizada de forma frecuente en la dieta humana. En el resto de las algas, el porcentaje de proteína está situado en torno al 17 %, equiparable a algunos vegetales de consumo habitual, como frutos secos o legumbres.

Al elaborar las harinas utilizadas como alimento con un 10 % de alga, todas tendrían, salvo Nori, similares porcentajes de proteína. Por ello, en el caso de la que contiene Nori, en su elaboración se emplea un 85 % de pienso estándar y un 5 % de almidón. De esta forma se consigue disminuir el porcentaje de proteína y consecuentemente, se obtiene un equilibrio proteico en todos los piensos (Tabla 4.6).

Tabla 4.6.- Contenido en proteína del pienso estándar , las algas y las harinas elaboradas (g/100 g de peso seco)

	Pienso estándar	Lechuga de mar	Wakame	Nori	Ramallo de mar	Espagueti de mar
Proteína	16,10	17,84	16,81	33,18	19,44	14,61
Proteína de la harina	-	16,27	16,17	17,00	16,43	15,95

4.2 Valoración de la calidad de la proteína

La composición en aminoácidos de las proteínas de las algas se comparó con el contenido de una de las proteínas de referencia en estudios de nutrición, la caseína. También, para evaluar la calidad proteica, se utiliza como referencia los requerimientos de aminoácidos esenciales para adultos (OMS-FAO 2007).

El valor nutricional proteico viene determinado por el contenido, proporción y disponibilidad de sus aminoácidos comparado con los que poseen las proteínas patrón así como la proporción de aminoácidos esenciales con respecto a los que no lo son (Friedman 1996; Galland-Irmouli y cols. 1999).

4.2.1 *Métodos químicos*

En la Tabla 4.7 se muestra el contenido en aminoácidos (mg/g de proteína) tanto de las algas como del pienso estándar y de la caseína.

Se determinan los 8 aminoácidos esenciales, histidina, treonina, metionina, valina, lisina, isoleucina, leucina, fenilalanina y los aminoácidos cisteína y tirosina que dependen respectivamente de los aminoácidos metionina y fenilalanina, lo que hace que la deficiencia de los primeros repercuta en una mayor demanda de los segundos.

El ácido glutámico y el ácido aspártico están presentes de forma significativa en todas estas algas, y lo mismo ocurre con la alanina. La arginina también destaca en Lechuga de mar, Wakame y Nori. Los valores de glicina, junto con las elevadas concentraciones de ácido glutámico y alanina ya señaladas, le pueden conferir el sabor característico por el que son apreciados muchos productos procedentes del mar (Holdt y Kraan 2011).

Tabla 4.7. Composición de aminoácidos (mg/g de proteína)

	Caseína	Pienso estándar	Lechuga de mar	Wakame	Nori	Ramallo de mar	Espagueti de mar
Ác. Aspártico	63,04	57,23	76,32	75,60	66,58	84,09	60,91
Serina	37,88	36,13	33,96	41,83	46,25	48,87	28,25
Ác. Glutámico	211,15	136,74	97,92	120,85	83,04	113,24	126,29
Glicina	17,30	51,55	49,82	65,75	75,39	51,64	38,75
Histidina	25,81	21,31	16,21	17,11	22,04	17,22	13,12
Arginina	55,08	29,72	70,88	88,19	89,98	30,44	22,23
Treonina	23,39	49,88	31,66	29,22	50,10	68,99	48,24
Alanina	29,54	61,02	60,50	97,57	80,54	85,82	79,30
Prolina	87,33	70,68	24,30	44,26	37,98	36,76	24,69
Metionina	24,18	16,67	20,34	1,41	13,73	20,78	15,82
Cisteína	5,93	7,07	9,99	3,26	4,58	24,85	3,74
Valina	57,79	29,16	45,40	58,48	47,98	44,90	32,18
Lisina	67,29	74,24	34,85	39,96	29,91	68,10	39,39
Isoleucina	50,38	28,69	37,21	50,82	34,44	39,46	29,97
Leucina	81,34	57,99	66,34	86,14	53,23	69,50	53,46
Fenilalanina	49,15	36,73	47,83	48,46	78,15	37,31	27,42
Tirosina	50,75	35,20	37,83	20,99	29,38	31,18	18,82

En general, los resultados de composición de aminoácidos son semejantes a los obtenidos por Qasim (1991); Sánchez-Machado y cols. (2004a); Bocanegra y cols. (2009); Cofrades y cols. (2010)

Una vez conocido el contenido en aminoácidos esenciales, se determina el valor nutritivo de las algas y del pienso estándar mediante el cálculo del **Índice químico** y el **Índice de Mitchell**.

Al utilizar la hidrólisis ácida como técnica de separación de los diferentes aminoácidos contenidos en las proteínas, el aminoácido esencial triptófano se destruye y la concentración de cisteína y metionina puede verse disminuida (Lourenço y cols. 2002). De esta forma la comparación de los aminoácidos de las algas con el pienso control y/o con la caseína se hace imprescindible.

Podemos observar que el índice químico (IQ), cuando utilizamos la caseína como patrón (Figura 4.2), es muy bajo para metionina+cisteína en Wakame (16 %); otros aminoácidos que no llegan al 50 % son la lisina en el caso de Nori y fenilalanina+tirosina en Espagueti de mar. Aunque este IQ puede resultar bajo para algunos aminoácidos, hay que tener en cuenta que los valores se están comparando con la caseína, que junto con la albúmina, son las proteínas más completas y por ello las que se utilizan como referencia. Los datos obtenidos cuando se comparan los IQ de las algas con los del pienso estándar se recogen en la Figura 4.3. En general, en estas algas los aminoácidos que presentan menores índices químicos son histidina, lisina y metionina+cisteína, con las excepciones de lisina y metionina+cisteína en Ramallo de mar, y también para este último tándem de aminoácidos en Lechuga de mar.

Al comparar los aminoácidos tanto de las algas como del pienso estándar con la caseína, mediante el índice Mitchell, se puede observar que el de las algas no está muy alejado del obtenido para el pienso estándar (75%) (Figura 4.4). El alga con el mayor índice Mitchell es Espagueti de mar (84 %), superando el del pienso estándar y el valor más bajo es para Ramallo de mar con un 61 % y seguido de Wakame con un 67 %.

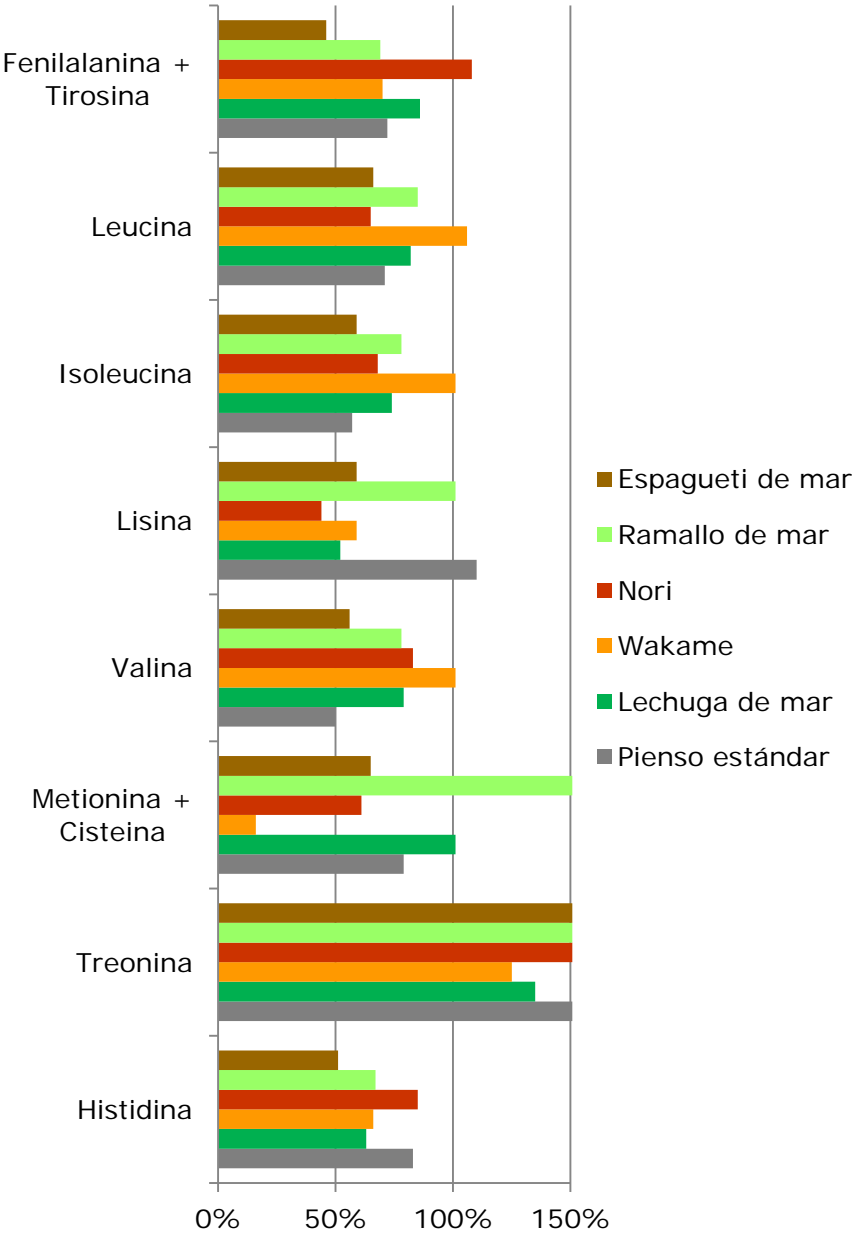


Figura 4.2.- Índice químico de los aminoácidos de las algas y el pienso estándar utilizando caseína como patrón

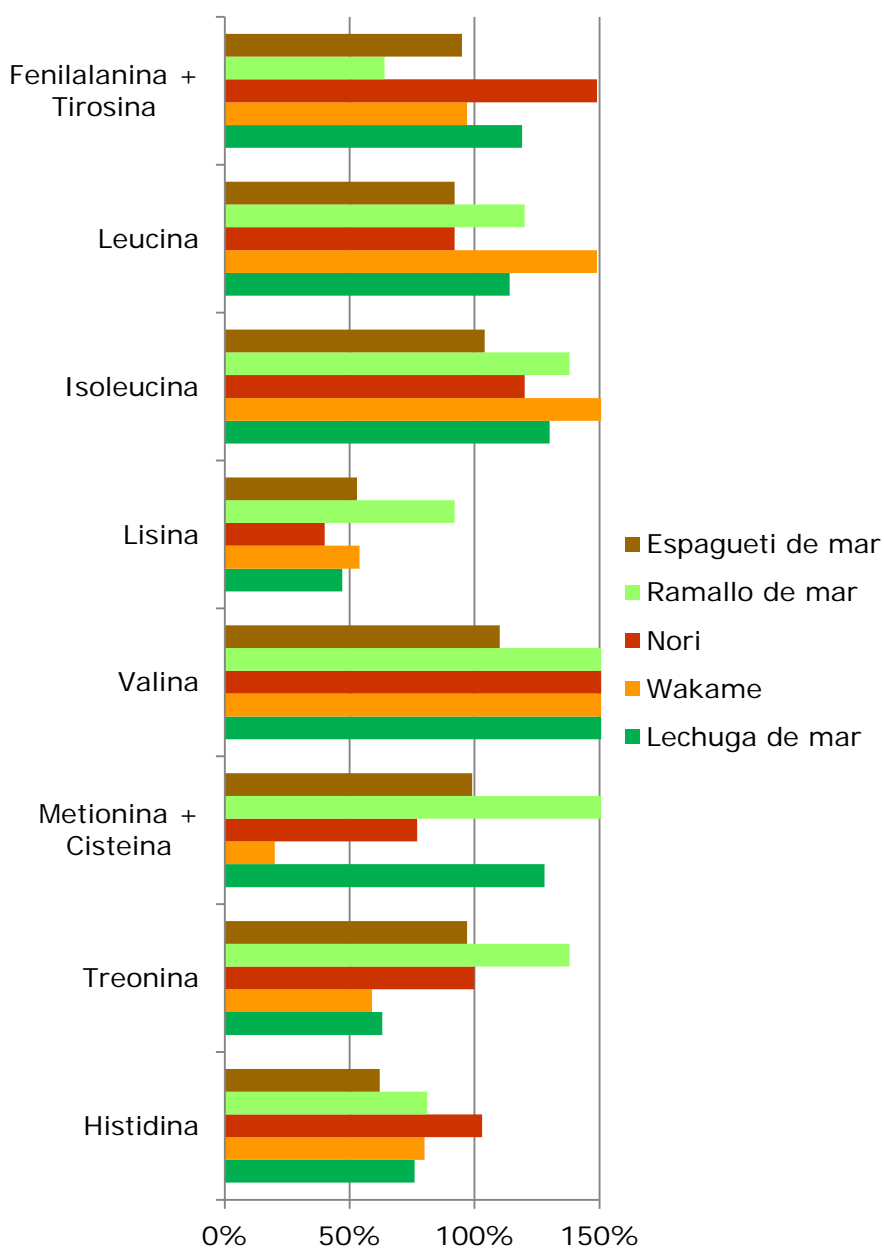


Figura 4.3.- Índice químico de los aminoácidos de las algas utilizando el pienso estándar como patrón

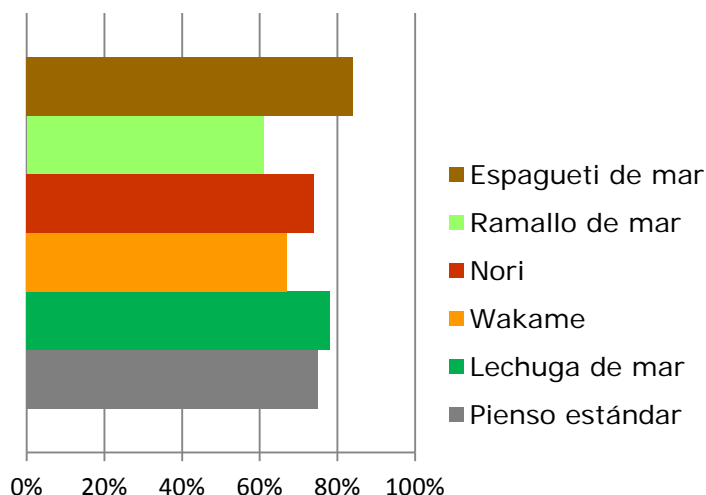


Figura 4.4.- Índice de Mitchel

En el **Índice de Aminoácidos (IAA)** y el **Índice de Proteínas (IP)** se comparan los aminoácidos esenciales con el patrón de proteína basado en los requerimientos indispensables de aminoácidos en adultos establecidos por la FAO/OMS/ONU en 2007. En el IAA, el aminoácido limitante en Lechuga de mar y Nori es la lisina, para Wakame sería la suma de metionina+cisteína, en Espagueti de mar el mayor déficit es para la valina y, por último, en Ramallo de mar ningún aminoácido tiene un IAA inferior a 1,00 (Figura 4.5).

El IP se emplea para comparar las proteínas en su conjunto en lugar de los aminoácidos esenciales de forma independiente. Dentro de las algas estudiadas la que mayor IP tiene es Ramallo de mar (1,00) seguido de Lechuga de mar con 0,97; a Nori y Espagueti de mar les corresponde un valor de 0,92 que se sitúa cerca del que tiene el pienso estándar (0,96) y el último corresponde a Wakame con 0,81 (Figura 4.6).

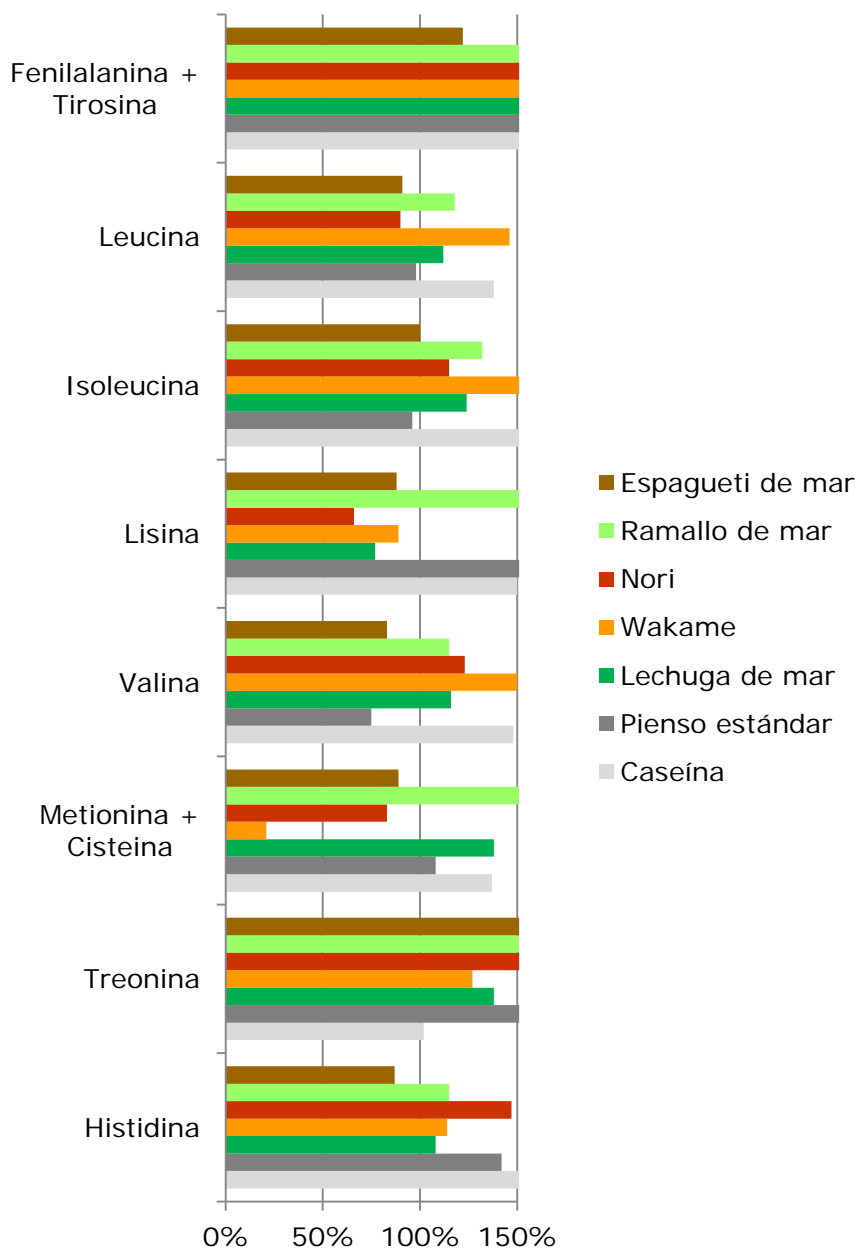


Figura 4.5.- Índice de aminoácidos de las algas con respecto al pienso estándar

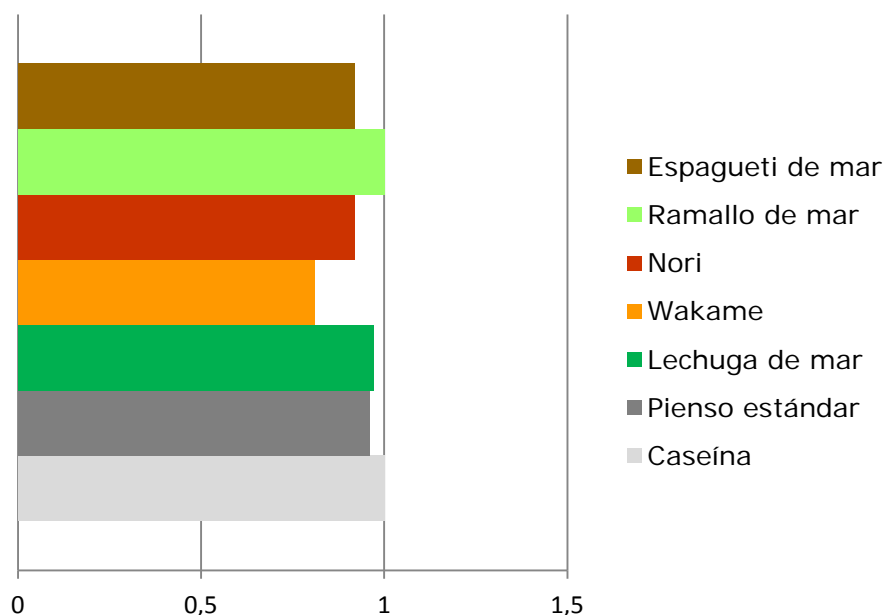


Figura 4.6.- Índice proteico de las algas y pienso estándar

Para calcular el valor del **Índice de Aminoácidos Corregido** (IAA corregido) se utiliza la composición de aminoácidos de las harinas teniendo en cuenta la proporción de alga que contiene cada una de ellas y el resultado de la digestibilidad de las proteínas estudiadas (Coeficiente de Digestibilidad Real). El CDR se muestra en la Figura 4.13. El dato de digestibilidad de la caseína fue extraído de estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Taboada y cols. 2006). Como se podía prever, como consecuencia de la mayoritaria proporción de pienso estándar en todos los grupos, el IAA corregido varía poco entre los distintos grupos, con cifras que oscilan entre el 57,43 del grupo de Espagueti de mar y el 68,23 de Wakame. El pienso estándar tiene un valor de IAA corregido de 63,64 (Figura 4.7).

En general, en todos los índices evaluados por el método químico estas algas tienen valores muy aceptables. En el índice de

Mitchel la peor valorada es Ramallo de mar y la mejor es Espagueti de mar, sin embargo si lo que se considera es el índice proteico, en última posición se sitúa Wakame y en cabeza Ramallo de mar. Al tener en cuenta la digestibilidad de la proteína contenida en los diferentes grupos cuando se utiliza el índice de aminoácidos corregido, los valores ya no son tan altos como en los índices anteriormente citados, pero si son muy similares al valor obtenido para el pienso estándar.

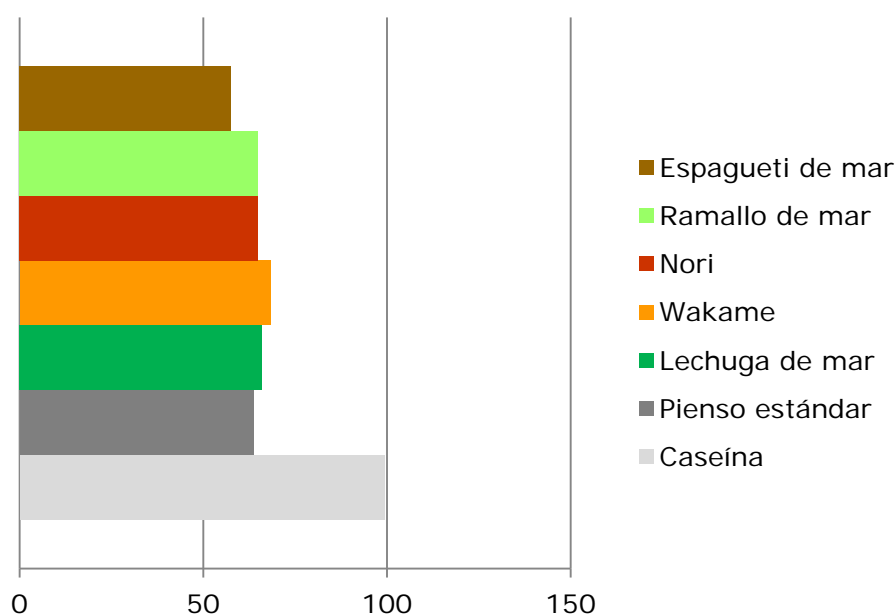


Figura 4.7.- Índice de aminoácidos corregidos de las algas y pienso estándar con respecto a la caseína

En general, las algas que se utilizan en la alimentación poseen una calidad proteica aceptable, un ejemplo de ello es Nori con una composición proteica cercana a la proteína de huevo (Mabeau y Fleurence 1993).

4.2.2 *Métodos biológicos*

Como ya se indicó en el apartado “Dietas y animales de experimentación” de “Material y métodos”, la alimentación de los animales se realiza en dos etapas, una primera en la que se evalúan Lechuga de mar, Wakame y Nori, y una segunda con Espagueti de mar y Ramallo de mar. En cada periodo se incluye un control de pienso estándar (Control I y Control II respectivamente). A efectos de análisis estadísticos cada grupo de algas se enfrenta a su grupo control correspondiente.

Cada animal del grupo control que se utiliza en la primera etapa ingiere por término medio 23,41 gramos diarios, y mientras que en la segunda, realizada con animales más pequeños, consumen una media de 16,84 gramos/día. De todas las algas, el grupo en cuya alimentación se incluye Lechuga de mar, con 25,68 gramos diarios de alimento ingerido, es el único que se diferencia significativamente de su grupo control (Figura 4.8).

La ganancia diaria de peso no se ve modificada con ninguna de las dietas utilizadas (Figura 4.8). La mayor ingesta del pienso elaborado con Lechuga de mar no se ve reflejada de forma significativa en el peso corporal.

La cantidad de **nitrógeno ingerido** por los animales, que forman parte tanto de los grupos control como de los grupos alimentados con algas se muestra en la Figura 4.9. Como se puede observar, el consumo de nitrógeno es mayor cuando el pienso contiene Nori, Wakame o Lechuga de mar, aunque sólo para esta última lo hace de forma significativa, sin duda debido a un aumento de la ingesta, puesto que los niveles de proteína son muy similares. En el caso de Ramallo y Espagueti de mar, el ligero descenso del nitrógeno ingerido con respecto a su control no es significativo.

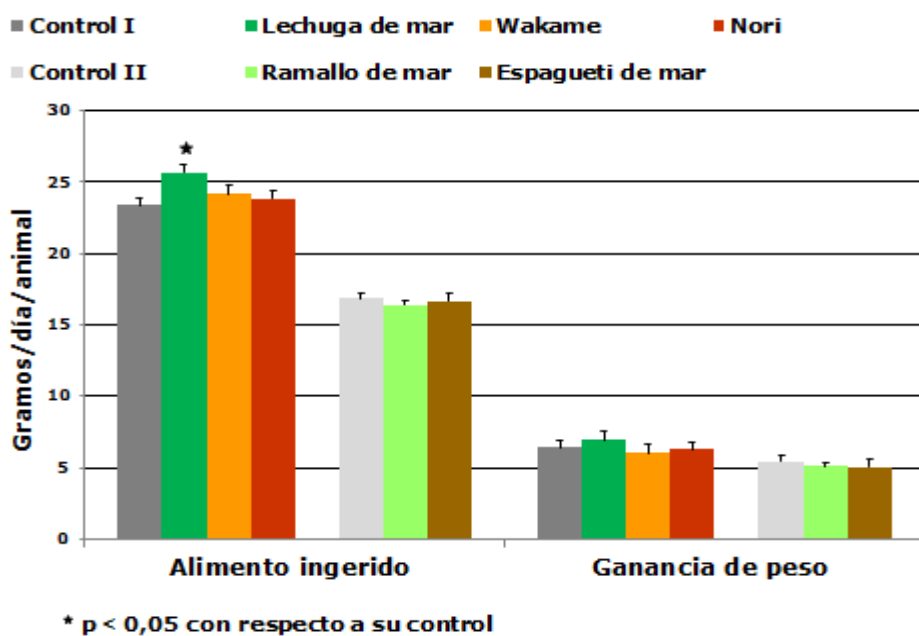


Figura 4.8.- Alimento ingerido y ganancia de peso

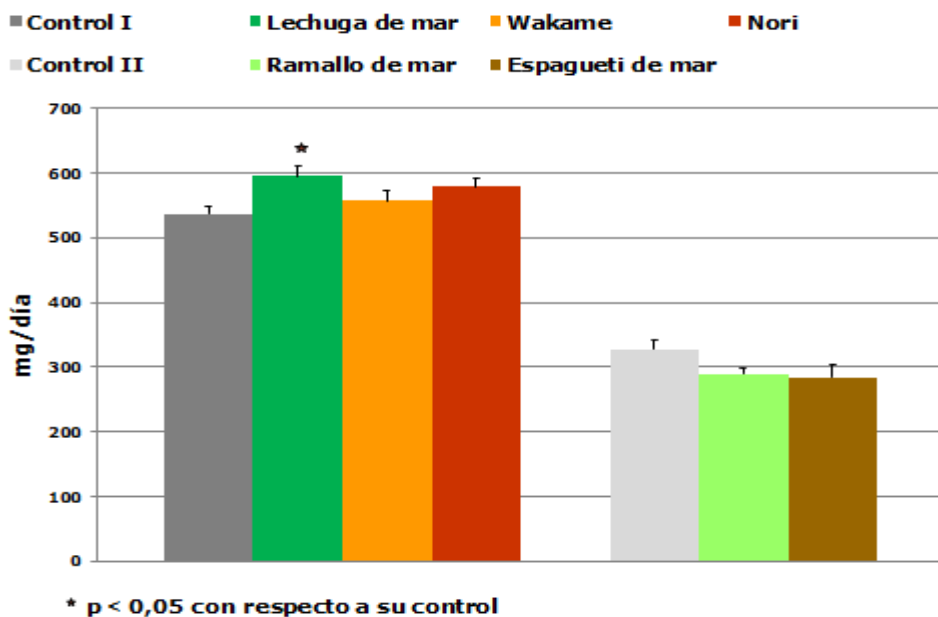


Figura 4.9.- Nitrógeno ingerido en el período principal

Los valores de nitrógeno ingerido en el período principal, el nitrógeno eliminado por la orina y el eliminado por la heces junto con los valores del nitrógeno absorbido, se utilizan para determinar los parámetros nutritivos por métodos biológicos.

El nitrógeno fecal eliminado durante el período endógeno del grupo que ingiere Nori es de 16,24 mg/día, superior a 10,36 mg/día que se elimina con el pienso estándar, lo que supone un valor de nitrógeno retenido de 392,98 mg/día, también mayor comparado con el del grupo control (325,80 mg/día). En los animales que consumen Espagueti de mar los valores de nitrógeno urinario endógeno y los de nitrógeno absorbido (aparente, real y retenido) son significativamente inferiores a los de sus respectivos controles (Figura 4.10, Figura 4.11, Figura 4.12).

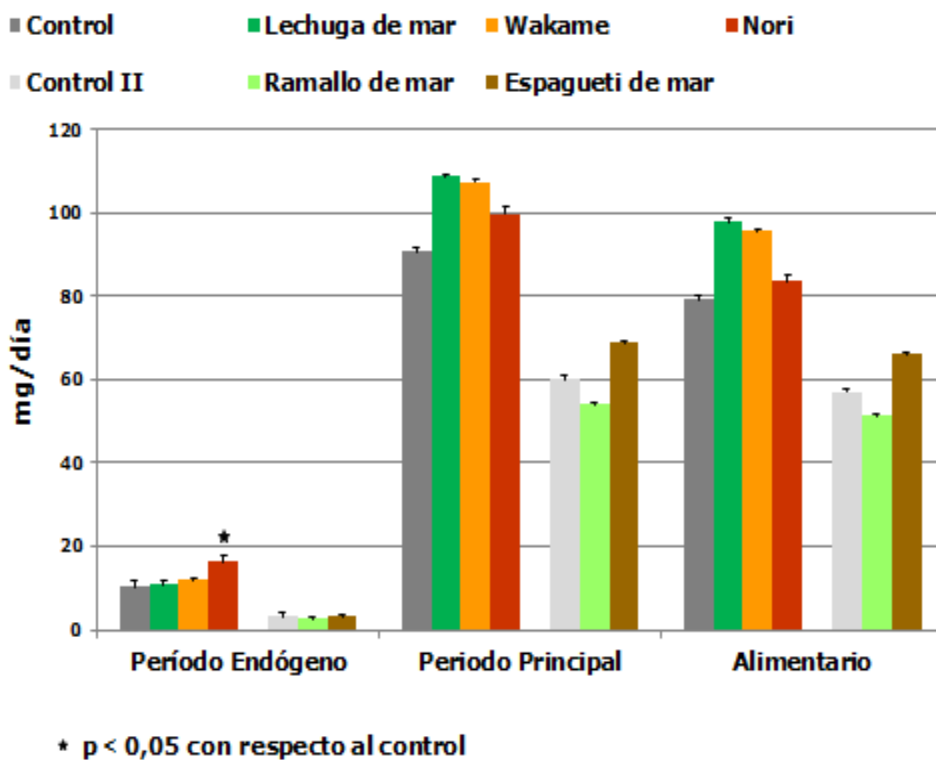


Figura 4.10.- Nitrógeno fecal excretado

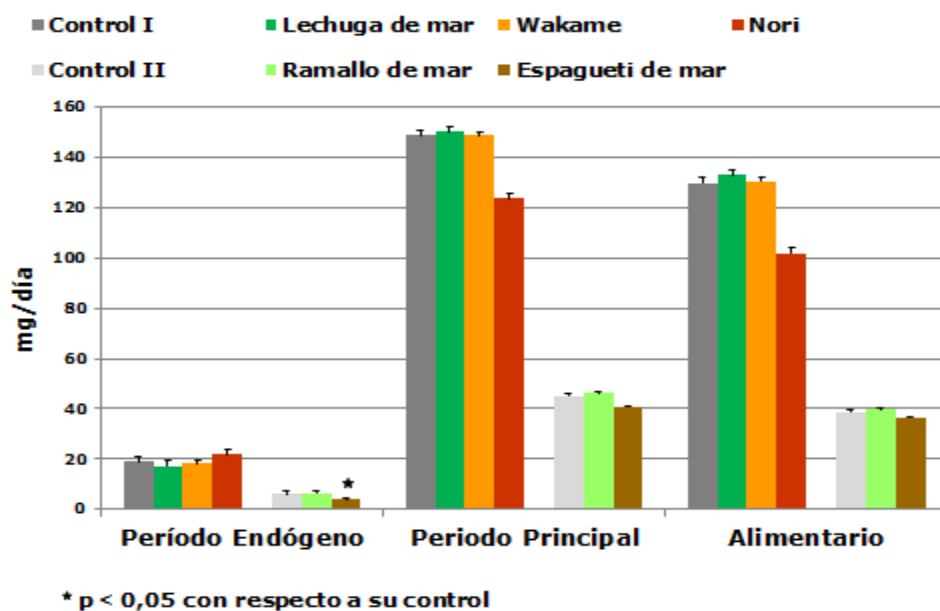


Figura 4.11.- Nitrógeno urinario excretado

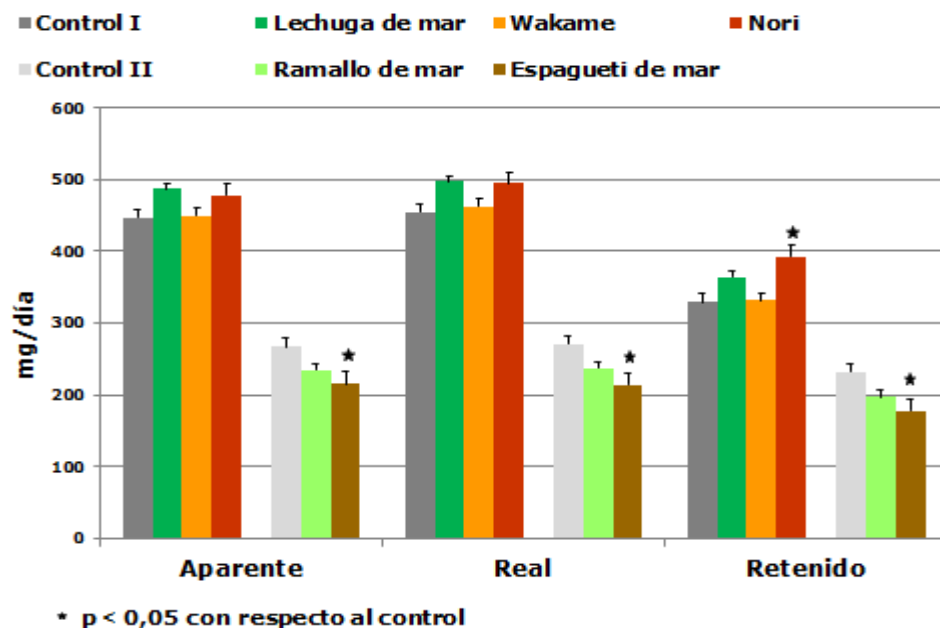
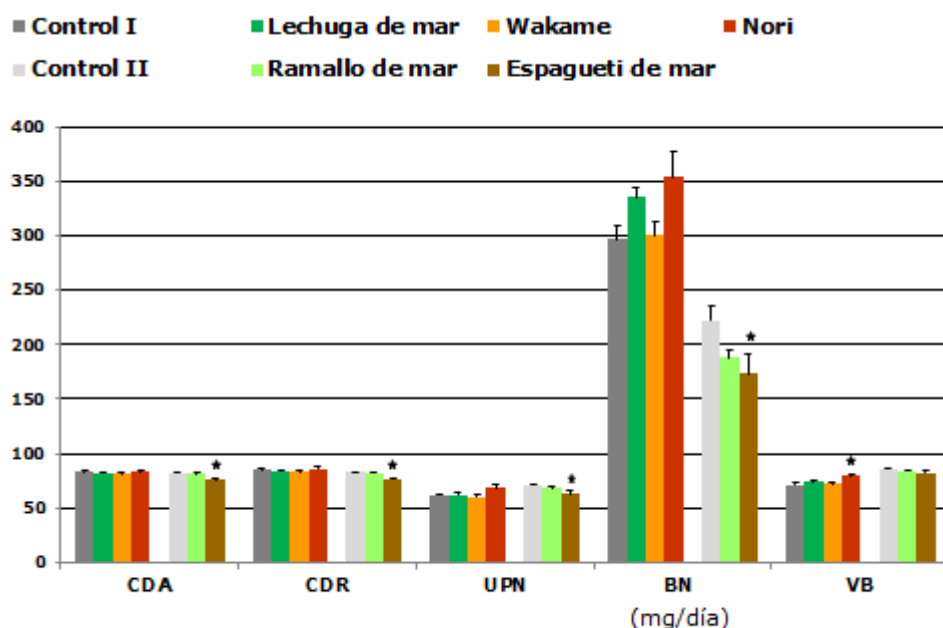


Figura 4.12.-Nitrógeno absorbido

Entre todos los índices nutritivos determinados: coeficiente de digestibilidad aparente (CDA), coeficiente de digestibilidad real (CDR), índice de utilización proteica neta (UPN), balance nitrogenado (BN) y valor biológico (VB), cabe destacar el parámetro que relaciona el nitrógeno retenido con el nitrógeno absorbido real, esto es el VB, del grupo experimental que ingiere el alga Nori, con un valor de 79,00 frente a un 71,36 del control, quizás debido a un mayor nitrógeno retenido (Figura 4.13).

El caso contrario lo presenta el grupo de Espagueti de mar, en el que los valores de nitrógeno absorbido aparente, real y retenido son significativamente más bajos que sus respectivos controles, lo que implica unos índices nutricionales también inferiores (Figura 4.13), agravado por un menor nitrógeno ingerido aunque en este caso la diferencia no es significativa. Todo esto implica un peor aprovechamiento de la proteína dietaria para el grupo en cuya dieta se incluye esta alga.



* $p < 0,05$ con respecto a su control

Figura 4.13.- Índices nutricionales

Otro índice utilizado para la evaluación nutritiva de las proteínas es el **coeficiente de eficacia proteica (PER)**, que relaciona el incremento de peso corporal con la cantidad de proteína ingerida. Salvo para Espagueti de mar, el resto de grupos tienen una menor relación crecimiento/proteína ingerida con respecto a su control, aunque la diferencia sólo es significativa en el caso de Ramallo de mar con una media de 1,81 frente al grupo alimentado con pienso estándar al que le corresponde un valor de 2,26 (Figura 4.14).

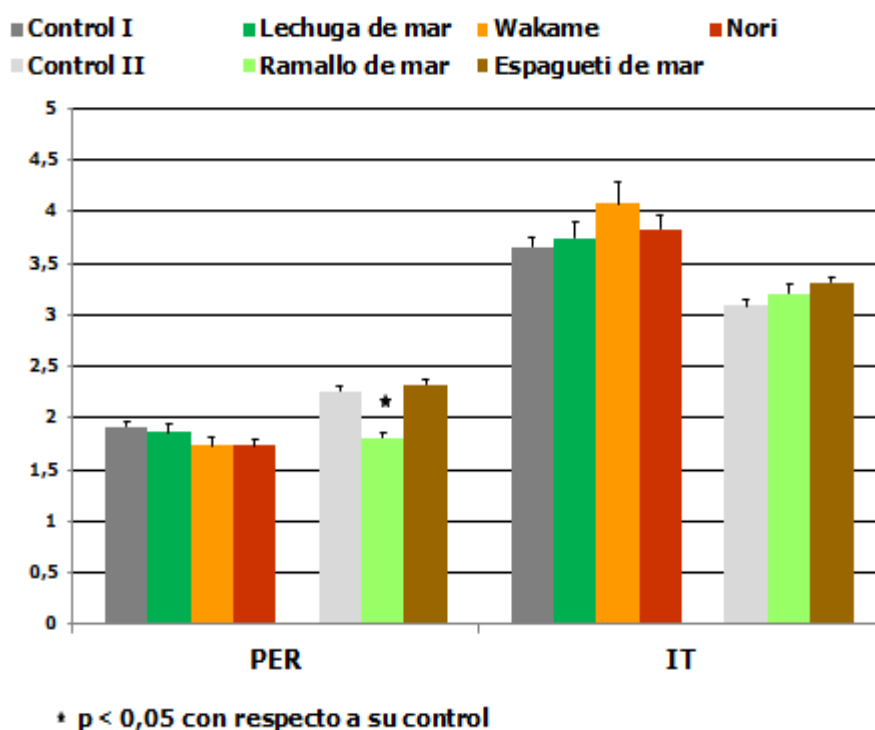


Figura 4.14.- Coeficiente de eficacia proteica (PER) e Índice de conversión de alimento (IT)

Se calcula también el **índice de conversión del alimento (IT)**, que relaciona la cantidad de alimento ingerido con la ganancia de peso de los animales. La consecuencia de la ingesta de harinas que contienen algas se refleja en un valor superior al de sus respectivos controles,

aunque no significativo. El dato más elevado es el de Wakame, con un IT superior en un 11,21 % al grupo control, seguido de Espagueti de mar con un 7,07 %, mientras que la menor diferencia es para Lechuga de mar con un 2,15 %. Por lo tanto, corresponden a Nori y Ramallo de mar los valores intermedios 4,61 % y 3,92 % respectivamente (Figura 4.14).

4.3 Peso relativo de los órganos

En la Figura 4.15 se muestran los resultados del peso relativo de diversos órganos y en ella se puede ver que éste no se modifica por la alimentación con los diferentes piensos que contienen Lechuga de mar, Wakame, Nori, Ramallo de mar o Espagueti de mar.

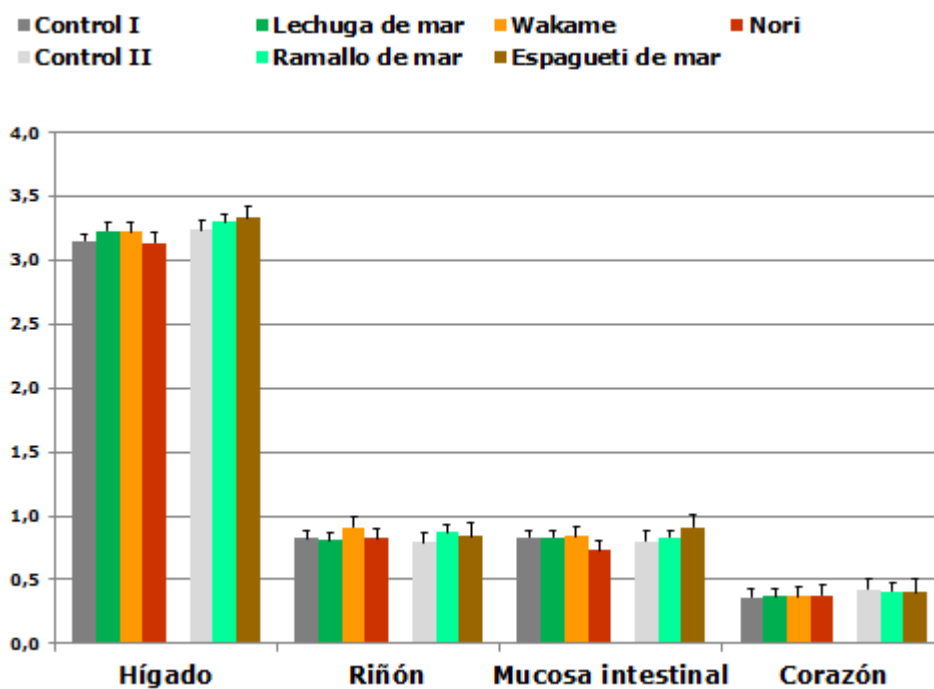


Figura 4.15.- Peso relativo de órganos (%)

4.4 Valores hemáticos

Como parte de este trabajo se analizan una serie de parámetros séricos que nos permiten conocer el perfil bioquímico de los diferentes grupos experimentales. Los dos grupos control de estos parámetros (Control I y Control II) son estadísticamente homogéneos entre sí, por ello, se representan como un único valor en las representaciones gráficas.

4.4.1 *Parámetros séricos que valoran la función cardiovascular*

El colesterol es un componente importante del cuerpo, empleado en la estructura de membranas celulares y en la síntesis de ácidos biliares y de hormonas esteroideas. Debido a que es insoluble en agua, la mayor parte del colesterol plasmático es transportado en forma de ésteres de colesterol por las lipoproteínas.

Las lipoproteínas plasmáticas se sintetizan tanto en el intestino como en el hígado, y son un grupo heterogéneo de complejos lípido-proteína compuesto por diversos tipos de lípidos y apoproteínas. Los dos vehículos más importantes para el suministro de energía a partir de lípidos son los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), ya que ambas contienen una cantidad relativamente elevada de triacilglicerolos. Los quilomicrones se forman en el intestino e intervienen en la absorción y transporte de triacilglicerolos, colesterol y vitaminas liposolubles procedentes de la dieta.

El hígado sintetiza VLDL y transporta los triacilglicerolos endógenos hasta los tejidos donde, especialmente en el tejido adiposo, son captados. En este proceso, las VLDL se convierten en lipoproteínas de baja densidad (LDL), que junto con las de alta densidad (HDL) están

implicadas en el transporte de otros lípidos, especialmente del colesterol.

El exceso de colesterol en sangre se correlaciona con diferentes patologías, y el valor elevado de triacilgliceroles se asocia con enfermedades vasculares. Pero más que el colesterol total, el factor de riesgo hay que considerarlo teniendo en cuenta el valor relativo de las fracciones que lo componen, ya que una de las funciones principales de las HDL es la de llevar colesterol al hígado para ser excretado en la bilis, por lo que se le atribuye un papel beneficioso.

La fracción LDL-colesterol se calcula, con relativa aproximación, utilizando la **Fórmula de Friedewald** (Friedewald y cols. 1972), válida siempre que la triacilglicerolemia no exceda de los 300 mg/dl.

$$\text{Colesterol LDL} = \text{Colesterol total} - (\text{Colesterol HDL} + \text{Triacilglicéridos} / 5)$$

En este trabajo, no se observan diferencias significativas en los niveles séricos de triacilgliceroles en ninguno de los grupos experimentales así como tampoco en el **colesterol total** de los grupos de Ramallo de mar y Espagueti de mar. Sin embargo, en los animales que reciben Lechuga de mar, Wakame y Nori el valor del colesterol total es más bajo que en el grupo control, aunque el efecto únicamente es significativo en los animales cuya dieta contiene Nori (Figura 4.16).

En el caso de la **HDL-colesterol** las diferencias entre los grupos son muy similares a las observados para el colesterol total, y de nuevo únicamente se encuentran diferencias significativas para el grupo que recibe Nori (Figura 4.16).

La fracción **LDL-colesterol** de los grupos de Ramallo y de Espagueti de mar son de la misma magnitud que el control, sin embargo hay una disminución significativa en los animales que ingieren Lechuga de mar, Wakame o Nori (Figura 4.16).

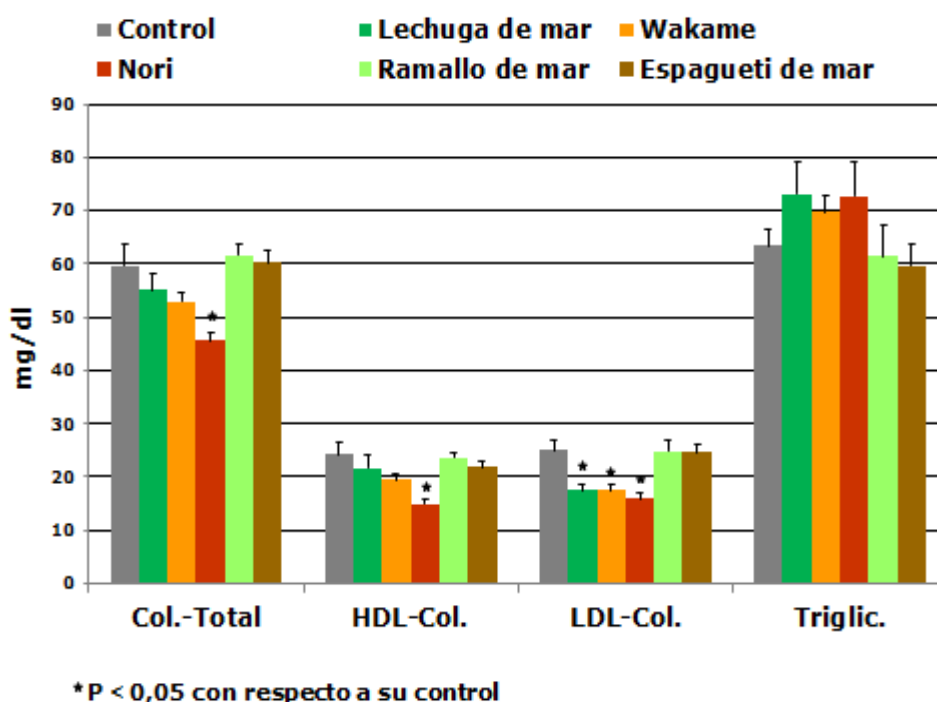


Figura 4.16.- Colesterol total, HDL-Colesterol, LDL-Colesterol y Triacilglicéridos en suero sanguíneo

Tanto en el **índice aterogénico**, expresado como colesterol total/HDL colesterol (Castelli y Levitar 1977), como en la relación **LDL/HDL**, no se encuentran diferencias significativas en ninguno de los grupos alimentados con algas frente a su control (Figura 4.17). Hay que tener en cuenta que aunque la fracción HDL del colesterol disminuye en algunos grupos también lo hace de una proporción similar la fracción LDL por lo que el efecto se compensa. Esto indica que no hay un riesgo cardiovascular añadido cuando se utilizan estas algas en la alimentación de los animales. Además, en los diferentes grupos experimentales el índice aterogénico oscila entre 2,1 y 2,6, con la excepción de Nori con un valor de 3,3, no alcanzándose nunca cifras superiores a 4, valor límite a partir del cual se empieza a considerar la existencia de un riesgo cardiovascular superior al normal (Study Group of European Atherosclerosis Society 1988).

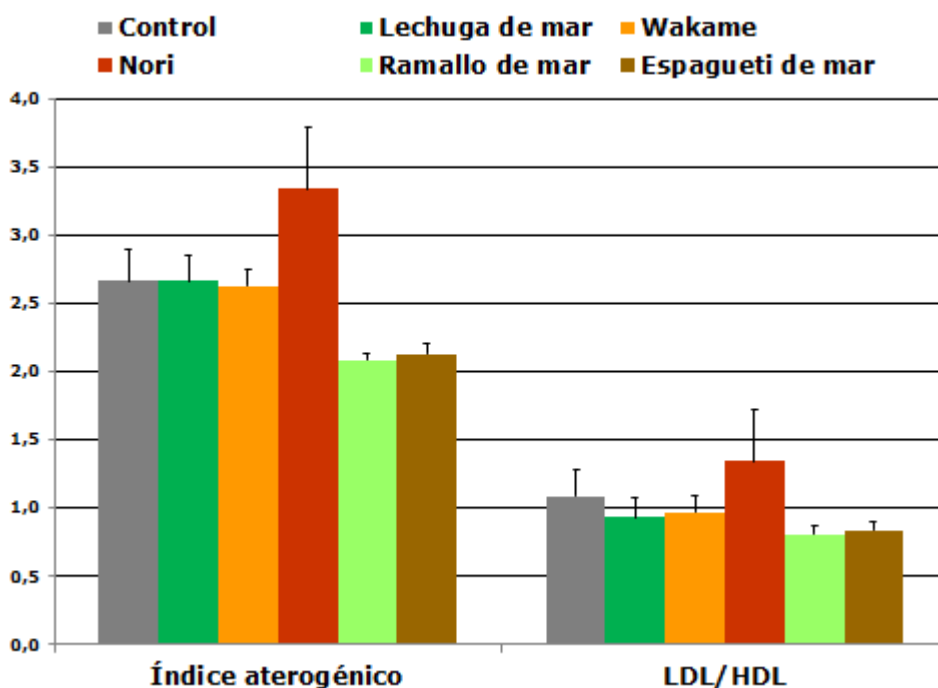


Figura 4.17.- Índice aterogénico y relación LDL/HDL

4.4.2 *Parámetros séricos que valoran la función renal*

Entre los componentes séricos analizados que influyen en la función renal, ni la albúmina ni la proteína total muestran cambios significativos frente al control en los diferentes grupos experimentales (Figura 4.18). Sin embargo, para el **Nitrógeno Ureico en Sangre (BUN)** (Figura 4.18), en todos los grupos que consumen algas, excepto para el que se alimenta con Lechuga de mar, hay un aumento significativo de este compuesto, aun cuando dicho incremento no es lo suficientemente elevado como para indicar un daño moderado en la función renal, ya que sus valores entran dentro del rango considerado normal en ratas Sprague Dawley (Robinson y cols. 2012)

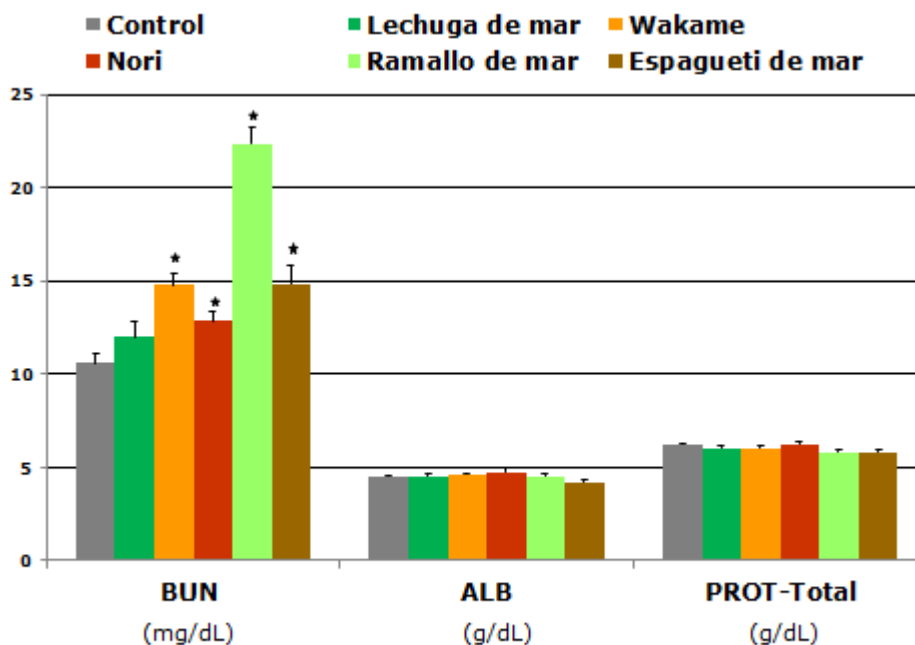


Figura 4.18. Nitrógeno ureico, albúmina y proteína total en suero sanguíneo

Las reacciones de desaminación, necesarias para la conversión de aminoácidos en glúcidos y grasas, suprimen el amoníaco producido por acción de la microbiota intestinal sobre las proteínas de la dieta y eliminan los residuos nitrogenados derivados del catabolismo, transfiriéndolos a la urea. Por tanto, la urea es el principal compuesto por el que se elimina el nitrógeno corporal, aunque éste también se libera en la orina como creatinina, amonio, aminoácidos, etc., pero en mucha menor cantidad. Por ello es, probablemente, que el incremento del nitrógeno ureico comentado anteriormente se deba a un ligero aumento del catabolismo proteico.

4.4.3 *Parámetros séricos que valoran la función hepática*

Para valorar la función hepática se mide la actividad de la **Glutamato Oxalacetato Transaminasa (GOT)** y la **Glutamato Piruvato Transaminasa (GPT)**, puesto que ambas transaminasas se utilizan como marcadores séricos de lesiones en el hígado (Egashira y cols. 1991).

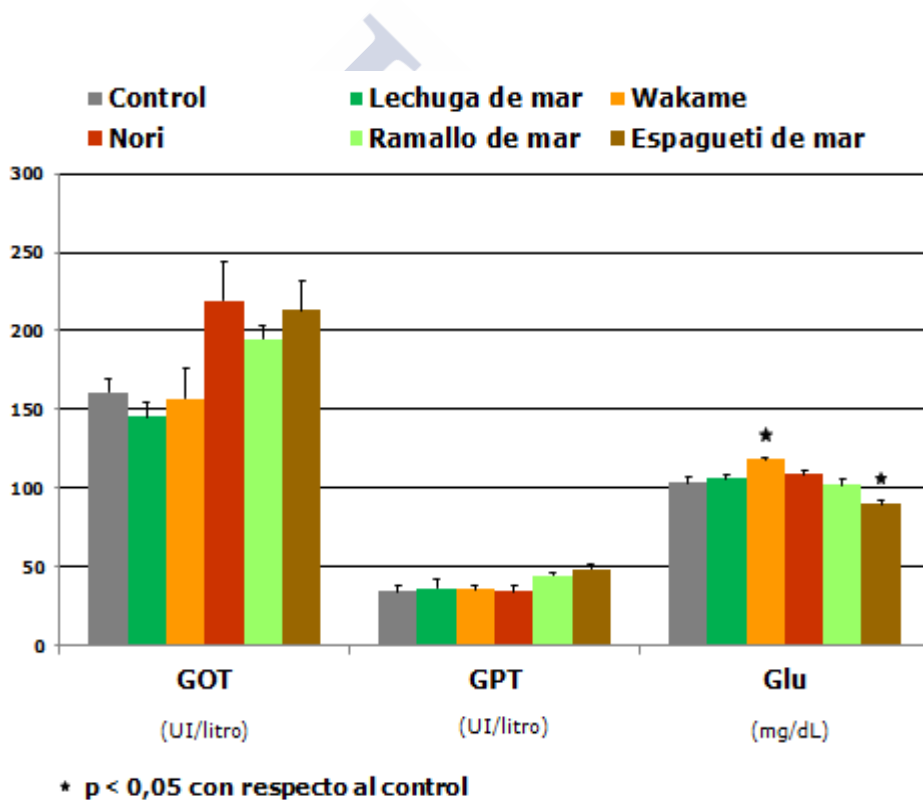


Figura 4.19.- Glutamato oxalacetato transaminasa, glutamato piruvato transaminasa y glucosa séricos

En nuestro estudio no hay diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos experimentales y el control para ninguna de las dos enzimas implicados en la función hepática (Figura 4.19).

4.4.4 ***Niveles séricos de glucosa***

Los niveles de glucosa en sangre están ligados a la cantidad y tipo de glúcidos, pero también a la proteína y a la grasa que se ingieren (Smart y cols. 2013). En nuestro estudio sólo se observan cambios significativos en los animales en cuya dieta se incluyen algas pardas. Concretamente, hay un aumento significativo de la glucemia en el grupo que ingiere Wakame (118.1 mg/dL) y un descenso también significativo en el que consume Espagueti de mar (81,3 mg/dL) con respecto al control (103,3 mg/dL) (Figura 4.18). Sin embargo, estos cambios en los niveles de glucosa entran dentro del rango normal para este tipo de roedores, que oscila entre 43,0 y 152,7 mg/dL para rata Sprague Dawley macho de 5 a 8 semanas (Goñi y cols. 2011). De todas formas, serían necesarios estudios más profundos para poder dilucidar el posible papel que las algas pardas ejercen sobre este parámetro.

4.4.5 ***Minerales séricos***

En la Figura 4.20 se muestran los niveles séricos de los minerales selenio, cobre, zinc, hierro y calcio, en los animales de los diferentes grupos experimentales. También se trató de cuantificar el manganeso, pero en este caso, la concentración se sitúa por debajo del límite de detección de la técnica empleada (0,05 mg/L).

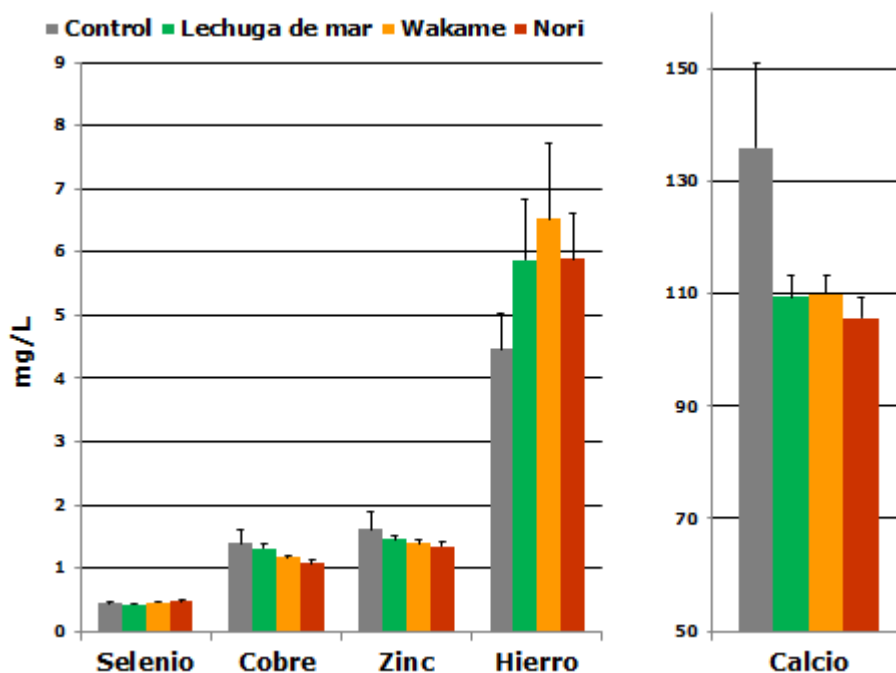


Figura 4.20.- Minerales en suero sanguíneo

En ninguno de los grupos experimentales se aprecian diferencias significativas en los niveles de estos minerales en suero sanguíneo, lo que indica que la inclusión de algas en la dieta no modifica significativamente los niveles de minerales asimilados en comparación al ampliamente estudiado pienso comercial.

4.4.6 *Aminoácidos en sueros sanguíneos*

La determinación sérica de aminoácidos en los diferentes grupos experimentales muestra que en el caso de los animales que reciben Lechuga de mar en su dieta, se producen disminuciones significativas en todos los aminoácidos excepto en arginina y cisteína, mientras que en el caso de Wakame y Nori el descenso es únicamente

significativo para lisina y norleucina con la primera alga, y cisteína y norleucina en la segunda. No se observan cambios significativos con respecto al control en el resto de aminoácidos analizados (Tabla 4.8).

	Control		Lechuga de mar		Wakame		Nori	
	Media	e.e.m.	Media	e.e.m.	Media	e.e.m.	Media	e.e.m.
ASP	25,4	± 2,6	11,5*	± 1,5	20,9	± 1,8	23,7	± 3,4
SER	460,8	± 32,9	230,7*	± 20,1	387,8	± 22,4	444,4	± 29,2
GLU	147,1	± 12,3	71,0*	± 3,7	109,4	± 10,3	130,6	± 12,0
GLI	525,9	± 25,0	300,1*	± 32,9	459,7	± 31,1	484,1	± 30,3
HIS	655,7	± 35,0	350,8*	± 38,1	594,1	± 39,4	682,8	± 40,7
TRE	538,6	± 10,2	172,6*	± 16,3	289,1	± 13,5	353,3	± 26,5
ARG	139,5	± 36,6	67,8	± 15,8	59,4	± 3,0	73,3	± 5,5
ALA	401,9	± 22,7	198,3*	± 18,4	364,3	± 21,6	443,2	± 33,5
PRO	171,2	± 10,4	92,8*	± 11,7	158,2	± 10,3	189,8	± 9,9
CIS	50,6	± 3,2	35,9	± 10,3	41,6	± 4,1	35,3*	± 3,1
TIR	148,5	± 7,1	90,4*	± 9,0	125,5	± 4,8	131,2	± 5,1
VAL	216,7	± 6,6	110,9*	± 11,6	209,7	± 11,1	211,5	± 9,6
MET	71,5	± 3,2	38,0*	± 3,6	65,0	± 3,9	70,2	± 3,6
LIS	543,1	± 48,8	255,4*	± 32,8	376,6*	± 30,2	420,9	± 39,7
ILE	137,8	± 4,7	72,5*	± 7,0	132,1	± 7,7	126,7	± 4,9
LEU	194,8	± 6,2	104,5*	± 10,5	190,1	± 10,9	183,0	± 8,1
NORLEU	8,0	± 0,5	4,4*	± 0,3	5,8**	± 0,3	6,2*	± 0,4
FEN	93,4	± 2,2	56,0*	± 5,8	90,7	± 5,1	91,3	± 3,5

* P < 0,05 con respecto a su control.

** P < 0,01 con respecto a su control

Tabla 4.8.- Aminoácidos en suero sanguíneo (micromoles/litro)

Mientras que la disminución en los niveles sanguíneos de diferentes aminoácidos puede deberse a ciertas enfermedades o a una nutrición inadecuada, el aumento de un aminoácido en particular podría

ser consecuencia de un problema en el organismo a la hora de metabolizar dicho aminoácido.

En este estudio, las harinas en cuya elaboración se incluyen algas tienen como principal componente la proteína del pienso estándar. Mientras que el grupo que ingiere Lechuga de mar se detectan, en casi todos los aminoácidos séricos, niveles significativamente inferiores a los del grupo control, estas disminuciones sólo son significativas para los aminoácidos lisina y norleucina en el grupo de Wakame, y cisteína y norleucina en el de Nori.

En cuanto a la relación entre aminoácidos esenciales y no esenciales (AAE/AANE), aunque se ve una ligera disminución de esta proporción cuando la dieta contiene algas, ésta no es significativa en ninguno de los grupos tratados, incluido el grupo que ingiere Lechuga de mar (Figura 4.21). Gustafson y cols. (1986) determinan que altos niveles dietarios de caseína, producen un aumento en suero sanguíneo de los aminoácidos esenciales y un descenso de los no esenciales. Además, estos mismos autores señalan que se puede observar una curva de saturación de crecimiento a partir de un 12 % de caseína, lo que indica que los valores más elevados de proteína no siempre van acompañados de un mayor aprovechamiento corporal. Por todo ello, se podría decir que, los niveles de proteína asimilados no son lo suficientemente diferentes como para provocar un desequilibrio entre los dos tipos de aminoácidos.

Cómo ya se comentó anteriormente, la concentración circulante de aminoácidos podría verse alterada por una dieta inadecuada, así como por los diferentes sustratos energéticos como son la glucosa, las grasas y las proteínas (Gonzales y Villena 2002). Sin embargo, la disminución de los niveles de aminoácidos, observada en los animales cuya dieta contiene Lechuga de mar, no sólo no influye negativamente en una menor ingesta, ya que en ellos aumenta el consumo de alimento, sino que además no se produce un descenso en su crecimiento.

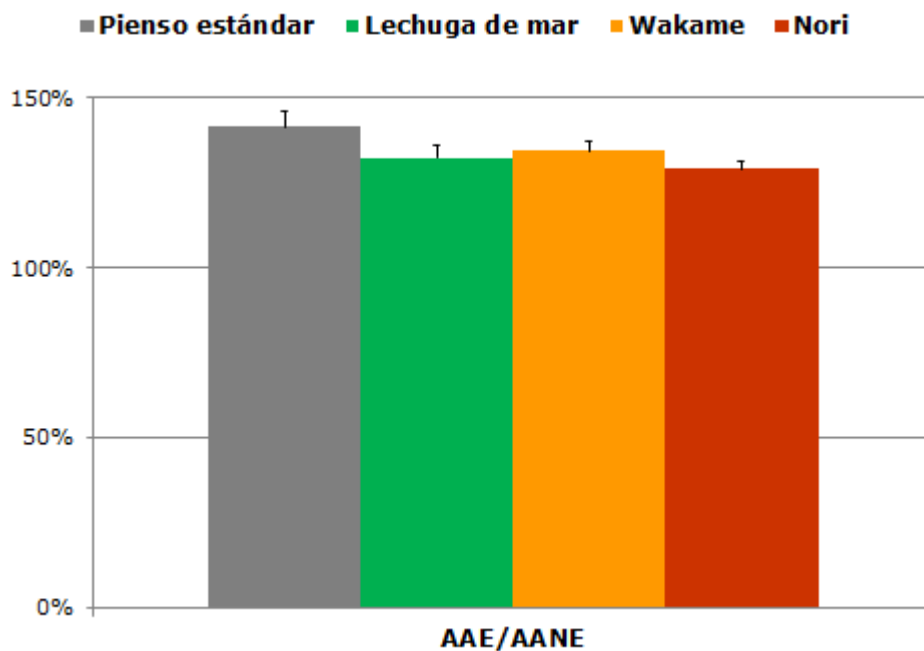


Figura 4.21.- Relación entre aminoácidos esenciales y no esenciales

4.5 Determinaciones nutricionales enzimáticas

La alta accesibilidad de la membrana de borde en cepillo de los enterocitos hace que estas estructuras interaccionen fácilmente con los componentes procedentes de los alimentos. Así, la actividad tanto de las disacaridasas como de las hidrolasas pépticas se podría ver alterada según la dieta ingerida (McCarthy y cols. 1980).

4.5.1 *Disacaridasas*

Las disacaridasas (maltasa, sacarasa y lactasa) son enzimas localizadas en la membrana del borde en cepillo del intestino delgado, y por tanto susceptibles de ser modificadas por contacto con diferentes compuestos. Los efectos que ejercen las dietas estudiadas sobre la actividad de estas enzimas hidrolíticas se muestran en la Figura 4.22. En ella se puede ver una disminución significativa en los grupos alimentados con piensos elaborados con Lechuga de mar, Wakame y Nori con respecto al grupo alimentado con pienso estándar comercial.

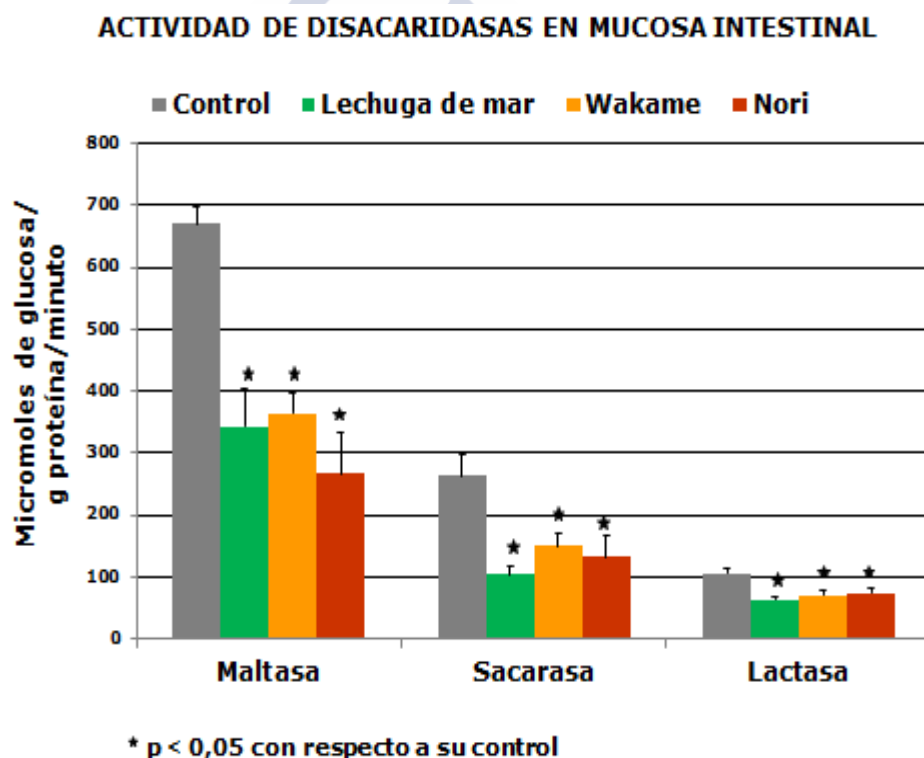


Figura 4.22.- Actividad de disacaridasas en mucosa intestinal

Choi y cols. (1998) consideran que el contenido y el tipo de fibra pueden influir en el descenso de la actividad de las disacaridasas, mientras que otros autores encuentran un aumento de la actividad de estas enzimas asociado al consumo de fibra soluble (Hedemann y cols. 2006). Gutiérrez y cols. (2002) observan que los niveles de la fibra no afectan ni a la morfología intestinal ni a la actividad de sacarasa y lactasa y, en este sentido, Montagne y cols. (2003) afirman que el efecto de la fibra dietética en la estructura del epitelio intestinal no está claramente asociado con cambios en la actividad enzimática.

La reducción de la actividad de las disacaridasas encontrada en este estudio puede ser una consecuencia de la composición de la dieta, debido a que no sólo los glúcidos ingeridos afectan a las enzimas localizadas en el borde en cepillo de los enterocitos, sino que también interviene el contenido calórico, proteico y la composición de aminoácidos (Goda y Takase 1994). Taboada y cols. (2003) encuentran un aumento en la actividad de la maltasa y la lactasa cuando se alimentan ratas Sprague- Dawley con harinas que utilizan como fuente proteica el equinodermo marino *Holoturia forskali*. Sin embargo, González y cols. (2000) utilizando el también equinodermo marino *Echinus esculentus* obtienen un descenso en la actividad de la lactasa. En ambos equinodermos el contenido en glúcidos es prácticamente cero, por lo que se deduce que son otros componentes del alimento la causa, al menos en parte, de las modificaciones en la actividad de estas enzimas.

Poullain y cols. (1989) aprecian que la morfología del yeyuno y la actividad de las disacaridasas se pueden ver alteradas por la estructura molecular de la proteína alimentaria, además del estado nutricional que puede simultáneamente interferir con estas modificaciones.

La composición en aminoácidos de las proteínas ingeridas también puede ejercer algún efecto en la actividad de estas enzimas como consecuencia de un desequilibrio en determinados aminoácidos (Rebolledo-Varela y Fernandez-Otero 1982). El déficit o exceso de alguno de ellos puede producir cambios en la actividad enzimática en

diferentes tejidos y órganos (Temler y cols. 1984). Así mismo, los ácidos grasos omega-3 pueden inducir cambios en la fluidez de la membrana de las células y en la actividad de las enzimas asociadas a ella o en receptores de membrana (Kinsella y cols. 1992).

Los estudios histológicos en ratas alimentadas con la dieta estándar para roedores y con un aporte de un 7 % de Kombu (*Laminaria digitata*) o Nori (*Porphyra tenera*), revelan una estimulación de la proliferación y desprendimiento de las células epiteliales del intestino, que podría ser una consecuencia de la producción de ácidos grasos de cadena corta por la microbiota intestinal (Bocanegra y cols. 2003).

En este sentido, tanto la composición de las algas a nivel proteico-aminoacídico y de fibra dietética como la alta proporción de ácidos grasos omega-3, pueden influir en la baja actividad de las disacaridasas que presentan los animales que consumen algas.

La inhibición de la actividad de estas enzimas encontrada en este trabajo, podría ser útil en el control de las alteraciones asociadas con la perturbación de la homeostasis de la glucosa.

4.5.2 ***Leucino aminopeptidasa (LAP)***

En la Figura 4.23 se puede observar que la actividad de la leucino aminopeptidasa en la mucosa del intestino delgado disminuye de forma significativa en el grupo que recibe Lechuga de mar y aumenta cuando se utiliza Wakame o Nori. En el caso de hígado y riñón los valores son muy similares entre sí, salvo en el riñón del grupo con Wakame en el que es mayor que en el grupo control, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa.

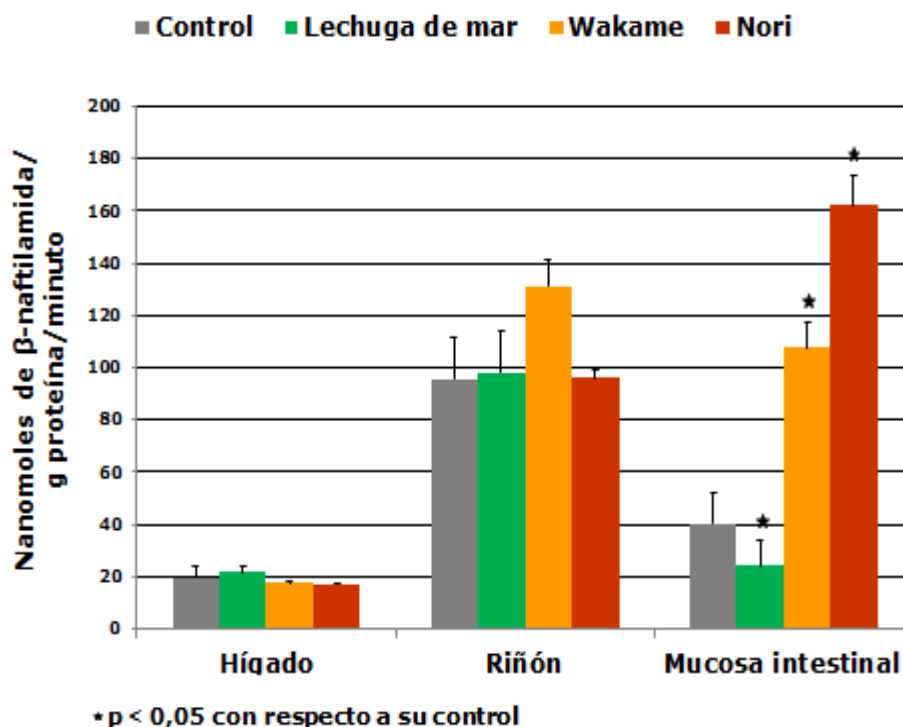


Figura 4.23.- Actividad de la leucino aminopeptidasa

La actividad de la leucino aminopeptidasa posiblemente se ve afectada por la calidad de la proteína y por el contenido en aminoácidos, ya que en ratas con una dieta carente de valina se observan cambios morfológicos en el intestino delgado y en la proliferación y maduración de las células de la mucosa intestinal (Kimura y cols. 1978b; Kimura y cols. 1979). Estos mismos autores, en otro estudio, sugieren que los aminoácidos dietéticos afectan notablemente al proceso de renovación celular de la mucosa, que podría acompañarse de un efecto directo en la formación de las vellosidades intestinales y comprueban que al suplementar la dieta con algunos aminoácidos (metionina, treonina y ácido glutámico) aumenta la actividad de la leucino aminopeptidasa (Kimura y cols. 1978a). Hayakawa y Lee (1992) observan que el orden de preferencia de esta

enzima por los sustratos es alanina > leucina > ácido glutámico > arginina.

El contenido en minerales de las dietas puede ser otro factor que afecte a la actividad de la leucino aminopeptidasa. La mayor presencia de ellos en las dietas con algas incrementaría el aporte de minerales activadores como pueden ser magnesio o manganeso, pero también aumentaría simultáneamente la presencia de aquellos que son inhibidores como níquel, zinc y cobre (Van Wart y Lin 1981).

En el caso del grupo cuya dieta contiene Lechuga de mar hay un descenso en la actividad de la leucino aminopeptidasa en la mucosa intestinal, como también ocurría con las disacaridasas, por el contrario, en los grupos que ingieren Wakame y Nori, en los que se reduce la actividad de las disacaridasas, hay un aumento de la leucino aminopeptidasa en mucosa del intestino. Como ya se indicó en el apartado anterior, la proteína o la grasa de la dieta pueden modular la actividad enzimática de las microvellosidades del intestino delgado (McCarthy y cols. 1980; Goda y Takase 1994; Kaur y cols. 1996) y con respecto a los glúcidos, estudios realizados en ratas utilizando como fuente de fibra: la celulosa, el salvado de avena y la pectina, dieron como resultado un aumento de la leucino aminopeptidasa en la mucosa intestinal frente a los animales que no recibían este tipo de fibra, sin embargo, no había variaciones en la actividad de la sacarasa (Schneeman y Farness 1982).

En resumen, los cambios que se encuentran en la actividad de las enzimas intestinales de los animales que reciben algas con el alimento, se pueden deber, no sólo a los nutrientes que componen las dietas como pueden ser proteínas, grasas, minerales y glúcidos considerados de modo independiente, sino también a las posibles sinergias e inhibiciones que pueden tener lugar entre ellos.

En cuanto al hígado y riñón, en los que no hay diferencias significativas en la actividad de leucino aminopeptidasa, se puede considerar como un buen resultado ya que un incremento en la

actividad de esta enzima suele ser indicador de problemas hepáticos o renales (Davy *y cols.* 1988; Bedir *y cols.* 1996).

4.5.3 *Gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT)*

La gamma-glutamyl transpeptidasa disminuye de forma significativa tanto en el hígado como en el riñón, para los grupos tratados con Wakame o Nori frente al control, mientras que se incrementa en el riñón de los animales que ingieren Lechuga de mar, no observándose cambios significativos en la mucosa intestinal de ninguno de los grupos experimentales (Figura 4.24).

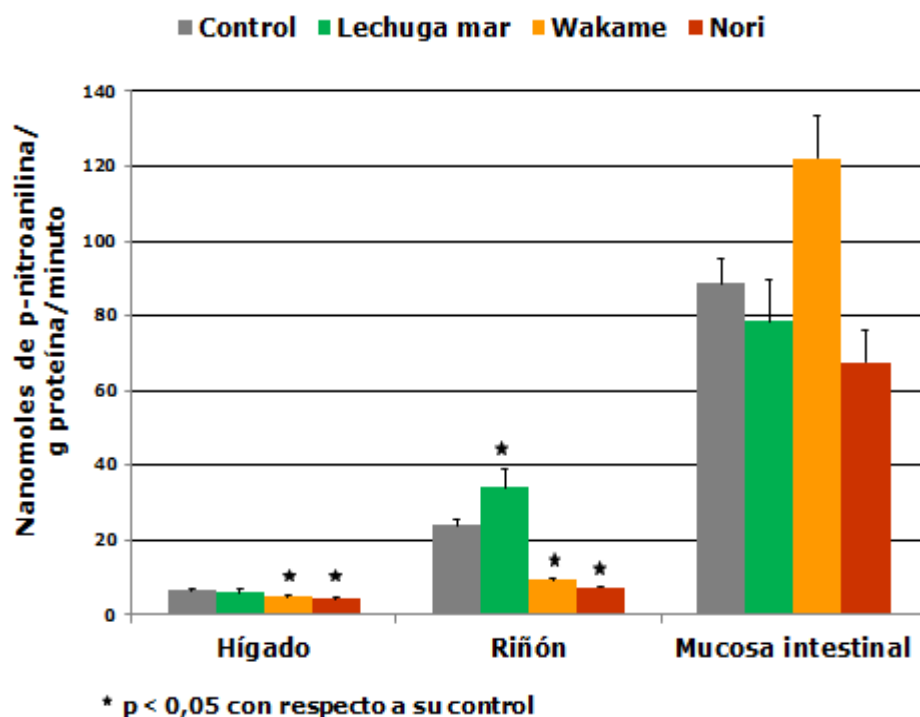


Figura 4.24.- Actividad de la gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT)

El papel fisiológico de esta enzima es probablemente mixto, interviniendo en el transporte de ciertos aminoácidos y en el metabolismo del glutatión (Lesgourgues y cols. 1984). El glutatión, que es un tripéptido no proteínico constituido por 3 aminoácidos: cisteína, glutamato y glicina, es el principal antioxidante de las células, ubicuo y ayuda a protegerlas de las especies reactivas del oxígeno como los radicales libres y los peróxidos (Pompella y cols. 2003).

Entre los diversos mecanismos que regulan la actividad de esta enzima está la preferencia de la gamma-glutamyl transpeptidasa por determinados aminoácidos, siendo buenos sustratos la cisteína, la glutamina, la metionina, la alanina, la serina y la glicina, así como muchos dipéptidos que contienen el aminoácido glicina (Garvey y cols. 1976; Thompson y Meister 1977; Karkowsky y Orlowski 1978; Ohata y Toda 2001), mientras que los que poseen prolina no son buenos sustratos (Garvey y cols. 1976). Además, algunos aminoácidos inhiben la actividad de esta transpeptidasa, como son la fenilalanina, la leucina, la lisina, la isoleucina y la arginina (Thompson y Meister 1977).

De acuerdo con lo comentado anteriormente, los resultados obtenidos con relación a la composición en aminoácidos de las tres algas utilizadas, podrían explicar su efecto en la actividad de gamma-glutamyl transpeptidasa, sobre todo teniendo en cuenta el bajo contenido en cisteína y metionina de Wakame y Nori y el elevado en Lechuga de mar. Además, también hay que valorar el posible efecto inhibidor de fenilalanina y arginina para los grupos de Wakame y Nori, cuyo contenido en fenilalanina es de 48,46 mg/kg para Wakame, y de 78,15 mg/kg para Nori mientras que el pienso estándar cuenta con 36,76 mg/kg de este aminoácido. En cuanto a la arginina, Wakame y Nori contienen 88,19 y 89,98 mg/kg respectivamente, frente al pienso estándar que solo tiene 29,72 mg/kg. En el caso de Lechuga de mar, aunque el valor de la fenilalanina es similar al de Wakame, sin embargo, para la arginina es aproximadamente un 27 % más bajo que el de las otras dos algas, lo que concuerda con la mayor actividad de la transpeptidasa en el riñón de los animales que ingieren esta alga.

Lahrichi y cols. (1982) señalan que la liberación de esta enzima del hígado al plasma se atribuye, en parte, a las sales biliares, así como a la modificación de la composición fosfolipídica en las membranas plasmáticas, lugar donde se localiza principalmente la gamma-glutamyl transpeptidasa. Además, Abbott y Meister (1983) consideran a los ácidos biliares causantes de un efecto inhibitor en la actividad de esta enzima. Teniendo en cuenta que las especies marinas contienen ácidos grasos omega-3, su consumo incrementaría el número de sales biliares (Fukushima y cols. 1999), las cuales podrían ejercer un efecto inhibitor en la actividad de la GGT. En consecuencia, es posible que la composición de la grasa cause variaciones en factores relacionados con esta actividad enzimática.

Al igual que sucedía en el caso de la leucino aminopeptidasa, hay que tener en cuenta que al pienso estándar se le adiciona un alga completa deshidratada y no productos derivados de una extracción o procesado previo, por ello, no son descartables posibles interacciones entre los diferentes compuestos del alga que podrían modificar la actividad de las enzimas objeto de estudio.

4.6 Determinación de la capacidad antioxidante

Diversos estudios han demostrado que casi todas las especies de algas marinas tienen buena capacidad para eliminar los radicales hidroxilo, y que también son inhibitoras de la oxidación de lípidos y de la proliferación celular *in vitro* (Yuan y cols. 2005; Heo y cols. 2005; Ganesan y cols. 2008). Sin embargo, pocos estudios *in vivo* han investigado el efecto del consumo de algas sobre la actividad enzimática endógena en animales de experimentación.

Las enzimas SOD, CAT y GPx son indicadores de la capacidad antioxidante celular y son responsables de la eliminación de EROs. Estas enzimas se consideran sistemas primarios de defensa que protegen a las macromoléculas biológicas del daño oxidativo, efecto éste que depende del tipo de alga y del órgano en cuestión (Ramírez-Higuera y cols. 2014).

4.6.1 *Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)*

Uno de los índices más frecuentemente utilizado para estimar el daño oxidativo a lípidos es la determinación de la peroxidación lipídica mediante la cuantificación de TBARS.

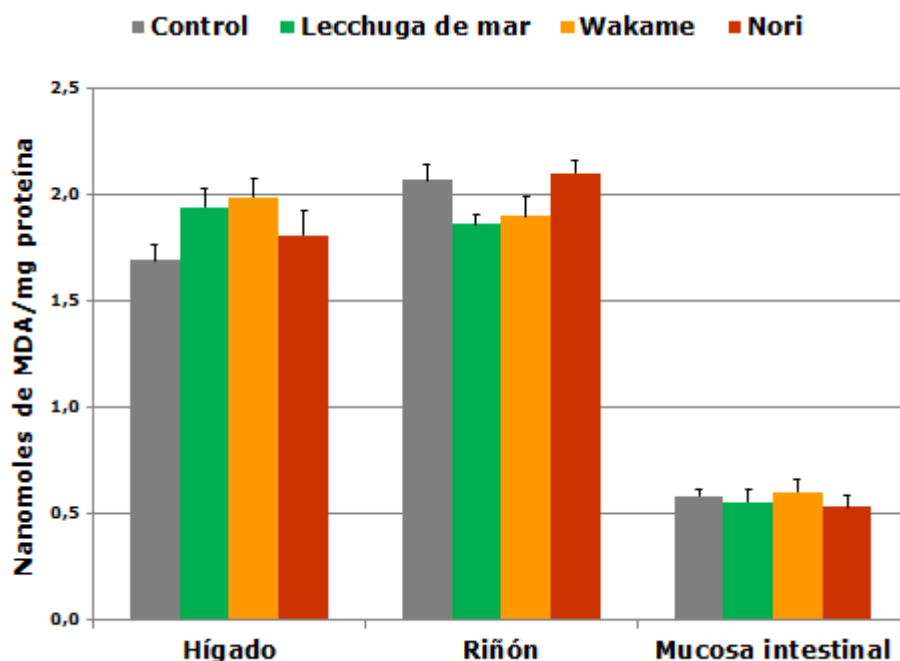


Figura 4.25.- Contenido de MDA en hígado, riñón y mucosa intestinal

La peroxidación lipídica es un indicador directo del daño producido en la membrana celular del tejido. En concreto, la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, principalmente fosfolípidos de la membrana, es una reacción en cadena que continúa hasta que el sustrato se consume completamente o finaliza debido a los antioxidantes. La peroxidación de lípidos produce daño estructural y funcional en las membranas, además de generar varios productos secundarios los cuales son ampliamente aceptados como indicadores de estrés oxidativo (Cherubini y cols. 2000), siendo el malondialdehído (MDA) uno de los productos finales de este proceso oxidativo.

En el presente estudio, los niveles de MDA no se modifican significativamente en ninguno de los órganos estudiados, lo que descarta la posibilidad de que el consumo de cualquiera de las algas objeto de estudio aumente el daño oxidativo en las membranas celulares (Figura 4.25). Estos resultados concuerdan con los de Raghavendran y cols. (2005) que utilizando un extracto de *Sargassum polycystum* y Zaragoza y cols. (2008) administrando un extracto de *Fucus vesiculosus*, así como con los obtenidos por Zhang y cols. (2004) que en suero y cerebro de ratones envejecidos, tratados con dosis bajas de la fracción galactano sulfatado aislada a partir de algas rojas, no observan diferencias en los niveles de MDA analizados, aunque estos últimos investigadores indican una disminución de los niveles de MDA en hígado y en corazón.

4.6.2 ***Superóxido dismutasa (SOD)***

La actividad de la superóxido dismutasa se determina en hígado, riñón, corazón y mucosa intestinal. La Figura 4.26 muestra cómo la inclusión en la dieta de Lechuga de mar, Wakame o Nori tiene poca repercusión en la actividad de esta enzima en los órganos estudiados.

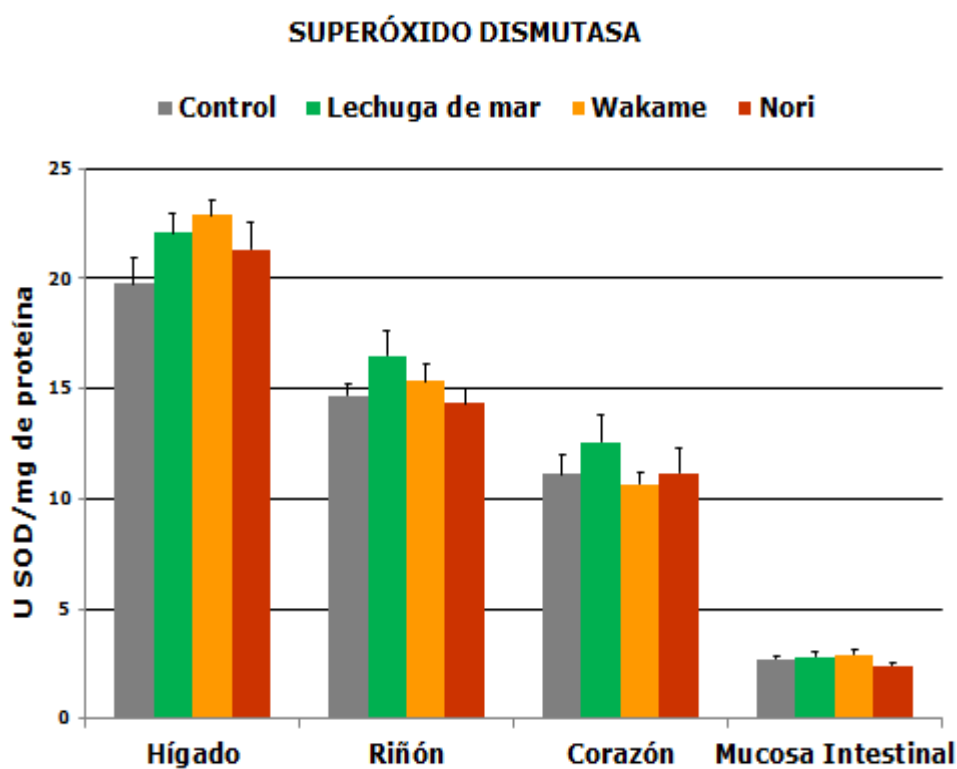


Figura 4.26.- Actividad de la SOD

Los radicales libres son una fuente de la peroxidación lipídica derivada del oxígeno y la primera línea de defensa contra ella es la SOD, enzima intracelular que protege contra el proceso oxidativo iniciado por el anión superóxido. Por lo tanto, una disminución en la actividad de la SOD refleja la incapacidad del tejido para secuestrar el exceso de aniones superóxido, lo que conduce al estrés oxidativo (Scott y cols. 2000). De estudios realizados administrando a ratas emulsiones o extractos de *Ulva linza*, *Lassonia trabeculata* y *Sargassum polycystum* puede deducirse que éstos no provocan alteraciones en la actividad de la SOD en hígado (Raghavendran y cols. 2005; Ramírez-Higuera y cols. 2014). Por otra parte, Zaragoza y cols. (2008) ensayan dos extractos diferentes de *Fucus vesiculosus* en eritrocitos, con uno de ellos no encuentran modificaciones pero sí observan un aumento

significativo de la enzima con el otro extracto, el cual presenta un menor contenido en polifenoles y mayor en fucoxantina. Además, Dousip y cols. (2014), en ratas hipercolesterolémicas muestran un aumento no significativo de la SOD en eritrocitos cuando los animales son tratados con extractos de *Kapaphycus alvarezzi* o *Sargassum polycystum*, sin embargo este incremento sí es significativo cuando se administran conjuntamente los dos extractos de algas.

La enzima SOD requiere de zinc y cobre para su papel antioxidante, por lo que se podría ver modificada su actividad ante cambios en las concentraciones séricas de estos micronutrientes (Roughead y cols. 1999). Pero como se indica en la Figura 4.20, en este estudio tampoco se observan diferencias significativas en las concentraciones séricas de ninguno de estos minerales cuando se comparan los distintos grupos que ingieren algas con el grupo control.

4.6.3 *Glutación peroxidasa (GPx)*

Los resultados de este trabajo reflejan aumentos significativos en la actividad de la GPx en hígado, corazón y mucosa intestinal de aquellos animales en cuya dieta se incluye Wakame y Nori, mientras que para los que ingieren Lechuga de mar sólo se observan aumentos significativos a nivel de mucosa intestinal. Cuando se analiza la actividad renal de la GPx se encuentra una tendencia contraria a la del resto de los órganos, con una menor actividad enzimática, aunque únicamente es significativa en los animales que reciben en su dieta Lechuga de mar (Figura 4.27).

La glutación peroxidasa tiene la capacidad de reducir una amplia variedad de hidroperóxidos tanto orgánicos como inorgánicos. En las células, la GPx convierte las especies reactivas del oxígeno potencialmente dañinas, como el peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos lipídicos, en productos inocuos como agua y alcoholes, al ligar su reducción con la oxidación del glutatión, y así protegen a la célula del efecto nocivo de los peróxidos.

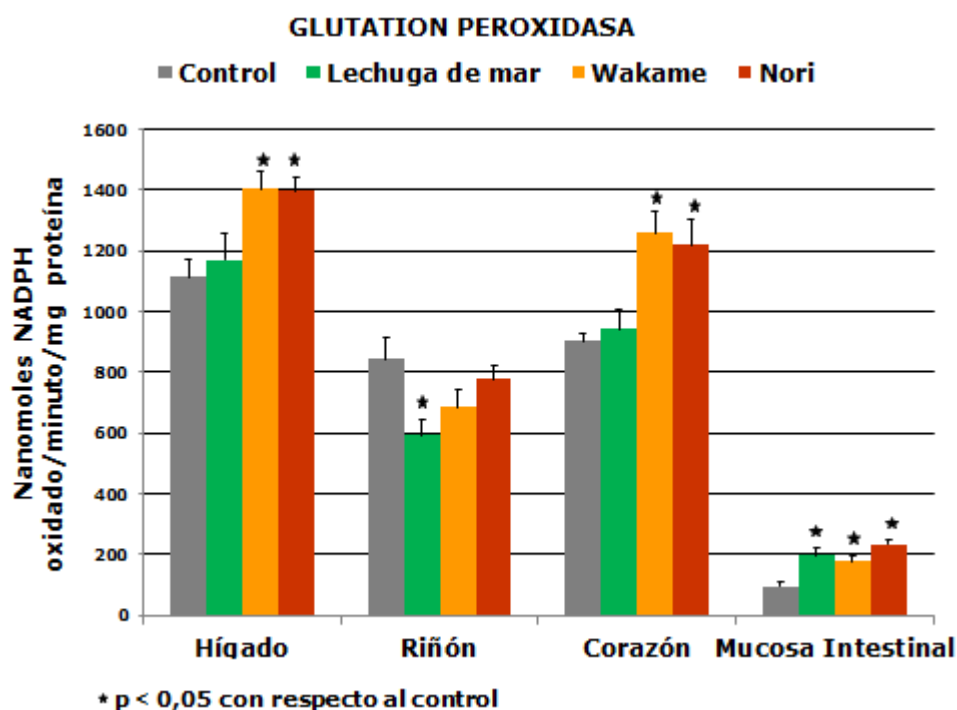


Figura 4.27.- Actividad de la GPx

La familia de las glutatión peroxidases en mamíferos comprende distintas selenoproteínas. La enzima clásica se distribuye de forma ubicua (hígado, riñón, corazón, tiroides, placenta, sistema nervioso central, etc.). Sin embargo, la isoenzima gastrointestinal se expresa exclusivamente en el tracto gastrointestinal en ratas. Esta distribución tisular inusual lleva a la hipótesis de que la GPx gastrointestinal representa una primera línea de defensa contra los hidroperóxidos de lípidos ingeridos (Chu y Esworthy 1995). Aunque la actividad total de la GPx en el intestino es sólo una décima parte de la del hígado, parece que este tejido podría tener un mecanismo de eliminación de hidroperóxidos altamente eficiente. Por lo tanto, la GPx parece ser el principal mecanismo de defensa antioxidante en el epitelio intestinal (Chu y cols. 1997). En el presente estudio, el aumento de la GPx gastrointestinal que se observa en ratas que consumen Lechuga de mar, Wakame o Nori puede constituir una barrera contra los

hidroperóxidos alimenticios. Además, la GPx gastrointestinal no sólo puede jugar un papel en la defensa contra hidroperóxidos ingeridos con los alimentos, sino también contra el H_2O_2 acumulado como un subproducto del metabolismo oxidativo en el hígado, que permite la eliminación de xenobióticos presentes en los alimentos.

Se sabe que el hígado es un órgano importante en la defensa contra la lesión tóxica por xenobióticos y toxinas endógenas, en la que las EROs pueden estar implicadas. Mantener el equilibrio entre la producción de EROs y la eliminación de radicales libres juega un papel importante en el mantenimiento de la función normal del hígado. Tas y cols. (2011) observan un aumento de la actividad tanto de la GPx como de la SOD en ratas normales alimentados con extractos de Lechuga de mar (*Ulva rigida*), mientras que la actividad de las enzimas no se altera en ratas diabéticas alimentadas con el mismo extracto. Bocanegra y cols. (2006) no encuentran diferencias en la GPx hepática cuando ratas normocolesterolémicas se alimentan con un pienso elaborado con un 7 % de Nori o Kombu; sin embargo, aumenta la actividad de la enzima cuando se utilizan animales hipercolesterolémicos que ingieren Kombu. Por otra parte, Park y cols. (2009) demuestran que la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y GPx en las células PC12 con daño oxidativo inducido, es mayor en las células tratadas con el alga parda comestible *Laminaria japonica* respecto a las no tratadas. En ratas con tumorogénesis inducida con 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) y alimentadas con un 2 % de *Laminaria religiosa*, la GPx del hígado disminuye al cabo de 14 días pero aumenta ligeramente de forma no significativa pasados 210 días (Maruyama y cols. 1991). Cuando se suministran diferentes fracciones de polisacáridos sulfatados extraídos del alga *Porphyra haitanensis* a ratones envejecidos, las enzimas GPx y SOD aumentan su actividad de forma muy generalizada y en diferentes órganos (Zhang y cols. 2003; Zhang y cols. 2004). Por otra parte, Ramírez-Higuera y cols. (2014) cuando administran emulsiones de *Ulva linza* y *Lessonia trabeculata* durante 8 semanas a ratas Wistar, encuentran un descenso significativo en la actividad de la GPx hepática para la primera alga y no significativo para la segunda.

Todas estas discrepancias bibliográficas pueden deberse a las diferentes metodologías utilizadas, en los que habría que tener en cuenta la proporción de las algas administradas, su procesamiento previo, su tiempo de administración o el estado inicial del animal utilizado en cada estudio.

La GPx es una enzima dependiente de selenio. Durante la síntesis de las selenoproteínas, se incorpora selenocisteína en una ubicación muy específica de la secuencia de aminoácidos con el objetivo de formar la proteína funcional. Por lo tanto, la biodisponibilidad del selenio, micronutriente esencial, es importante ya que ejerce su acción como cofactor de esta enzima con actividad antioxidante (Huang *y cols.* 2002). En nuestro estudio, los valores séricos de selenio no reflejan cambios significativos entre los grupos alimentados con algas y los del grupo control (Figura 4.20), por lo que cabe deducir que las modificaciones en la actividad de la GPx en los diferentes órganos parecen no están correlacionados con la biodisponibilidad de este micronutriente, al igual que sucedía con la actividad de la SOD y la biodisponibilidad de cobre y zinc.

En resumen, Wakame y Nori, algas parda y roja respectivamente, muestran importantes incrementos en la actividad de la glutatión peroxidasa en hígado, corazón y mucosa intestinal, lo que podría conllevar efectos beneficiosos en dichos órganos al ejercer en ellos un papel protector contra el daño oxidativo.

4.6.4 *Catalasa (CAT)*

Los resultados en el análisis de la actividad de la CAT reflejan un aumento de esta enzima en el hígado de los animales alimentados con pienso que contiene el alga Nori, mientras que en este órgano no hubo diferencias apreciables en el resto de grupos experimentales; además, tanto en riñón como en corazón los datos fueron similares en todos los grupos (Figura 4.28).

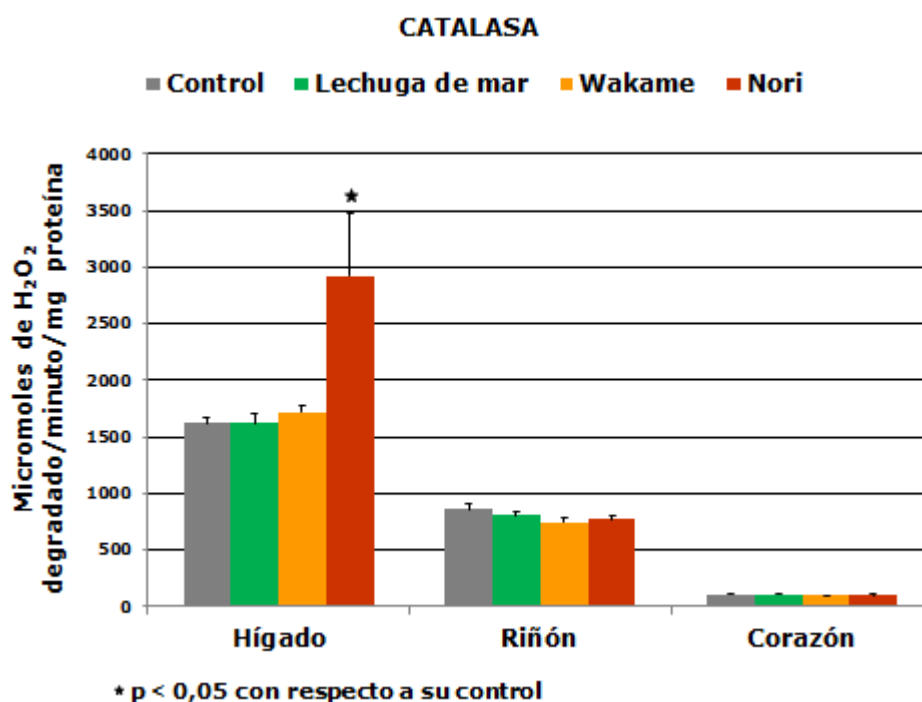


Figura 4.28. Actividad de la CAT

Zaragoza y cols. (2008) cuando administran extractos del alga *Fucus vesiculosus*, muestran que la reducción del estrés oxidativo en plasma es mayor en el extracto con un contenido polifenólico menor y con más fucoxantina, aunque en ese estudio no encuentran diferencias significativas en los niveles de CAT en eritrocitos. Además, Ramírez-Higuera y cols. (2014), no aprecian cambios en la actividad hepática de la CAT al utilizar emulsiones de *Ulva linza* y *Lessonia trabeculata*. Del mismo modo, la administración durante 15 días de extracto de *Sargassum polycystum* tampoco modifica los niveles hepáticos de CAT (Raghavendran y cols. 2005).

Aunque no está claro cómo la ingesta de algas marinas comestibles conduce a una variación en la actividad de las enzimas, es posible que éstas se modifiquen en función de la composición en fucoidanos, carragenatos, compuestos fenólicos, etc., presentes en las

algas (Chkhikvishvili y Ramazanov 2000; Wijesekara y cols. 2011; Freile-Pelegín y Robledo 2014).

La enzima GPx funciona en tándem con la CAT para secuestrar el exceso de H_2O_2 , así como peróxidos de lípidos en respuesta al estrés oxidativo (Halliwell 1999). Sin embargo, la actividad de la CAT aumenta solamente en el hígado de los animales alimentados con la dieta elaborada con Nori. A bajas concentraciones de H_2O_2 , el aumento de la eficiencia de la actividad de GPx, en relación a la actividad catalasa, ha llevado a sugerir que la GPx puede ser más importante para el metabolismo de H_2O_2 a concentraciones relativamente bajas de éste, mientras que la mayor relevancia de la catalasa corresponde al metabolismo del H_2O_2 cuando las concentraciones son relativamente altas. Además, la GPx reacciona con un amplio espectro de hidroperóxidos orgánicos, en contraste a la especificidad relativa de la catalasa para el H_2O_2 (Polavarapu y cols. 1998).

La diferente compartimentación celular de CAT y GPx afecta a los mecanismos de eliminación del H_2O_2 . Así por ejemplo, el H_2O_2 que procede de las enzimas peroxisomales se transforma en su mayor parte por la CAT, mientras que aquel que se encuentra en el citosol, procedente de mitocondrias o retículo endoplasmático por acción de enzimas como CuZnSOD, es eliminado mayoritariamente por la GPx, presente en la mitocondria pero cuya mayor concentración la podemos encontrar en el citosol (90 %). La capacidad antioxidante de una enzima u otra es diferente según el órgano en el que se analice y de esta manera, la GPx es muy efectiva en órganos como el hígado pero no lo es tanto en otros como pueden ser pulmón, ojo y músculo (Halliwell y Gutteridge 2007).

Es evidente que tiene que haber un equilibrio entre la SOD y las enzimas que eliminan el H_2O_2 del medio. Un aumento en la actividad de la SOD debe corresponder con un aumento similar en la actividad de GPx y/o CAT, de forma que se mantenga el equilibrio oxidativo necesario para evitar daños celulares. Así, un descenso en la relación GPx/SOD, CAT/SOD ó GPx+CAT/SOD posiblemente es indicativo de

un aumento en la generación de H_2O_2 . El equilibrio de la actividad de estas enzimas puede ser tan crítico en la defensa contra las especies reactivas de oxígeno como la actividad de las propias enzimas en sí.

Estas relaciones enzimáticas se ven afectadas en procesos o enfermedades tales como envejecimiento, síndrome de Down o epilepsia (Groner y cols. 1986; de Haan y cols. 1996).

Los animales en cuya dieta se incluye Wakame o Nori presentan una buena relación GPx/SOD y GPx+CAT/SOD en corazón, del mismo modo que se observa un aumento significativo en la relación GPx/SOD en la mucosa intestinal de aquellos animales que ingieren Lechuga de mar o Nori (Tabla 4.9).

Como se comentó previamente el alga roja Nori tiene importantes efectos sobre la actividad enzimática antioxidante en hígado, corazón y mucosa intestinal, lo cual es coincidente con los hallazgos de Chen y cols. (2006), quienes indican, mediante estudios *in vivo* e *in vitro*, que derivados polisacáridos de algas rojas pueden actuar como hepatoprotectores.

En este estudio, las relaciones de CAT/SOD y GPx+CAT/SOD en el hígado (Tabla 4.9) aumentan significativamente en el grupo experimental que consume Nori, lo que conjuntamente con la mayor actividad de la GPx observada en este órgano, permite afirmar que el hígado, principal lugar de formación de radicales libres, presenta una mayor resistencia al daño oxidativo en los animales que ingieren en su dieta Nori.

En general, aunque los mecanismos por los que el consumo de algas contribuye a incrementar la actividad enzimática todavía no están definidos, los datos obtenidos en este trabajo sugieren que añadir algas pardas o algas rojas a la dieta altera la actividad enzimática antioxidante, principalmente, en hígado, corazón y mucosa intestinal, contribuyendo de esta manera a crear un entorno antioxidante en dichos órganos y generando un efecto protector en sus células, lo que ayudaría a disminuir el riesgo de contraer muchas de las enfermedades crónicas.

Tabla 4.9.- Relaciones entre GPx/SOD, CAT/SOD y GPx+CAT/SOD

		CONTROL	LECHUGA DE MAR	WAKAME	NORI
Hígado	GPx/SOD	57,86 ± 4,10	56,11 ± 2,75	61,08 ± 3,31	67,37 ± 4,27
	CAT/SOD	84,17 ± 5,79	73,64 ± 4,40	74,57 ± 4,56	112,32 ± 4,57*
	GPx+CAT/SOD	142,68 ± 9,13	129,26 ± 9,13	135,65 ± 6,46	179,69 ± 7,63*
Riñón	GPx/SOD	59,77 ± 4,64	37,54 ± 4,41*	45,81 ± 4,52	55,39 ± 3,93
	CAT/SOD	58,87 ± 3,30	50,9 ± 5,24	49,45 ± 3,55	54,3 ± 4,04
	GPx+CAT/SOD	118,68 ± 4,54	88,43 ± 8,87*	95,26 ± 7,04	111,68 ± 7,08
Corazón	GPx/SOD	87,9 ± 6,09	76,58 ± 4,37	118,16 ± 6,03*	120,97 ± 7,20*
	CAT/SOD	9,7 ± 0,92	9,16 ± 0,78	8,94 ± 0,82	9,6 ± 0,97
	GPx+CAT/SOD	97,7 ± 6,95	85,7 ± 4,92	127,1 ± 6,59*	131,24 ± 7,81*
Mucosa intestinal	GPx/SOD	35,08 ± 3,70	71,46 ± 11,00*	60,58 ± 4,89	97,98 ± 5,80**

* p < 0.05 con respecto a su control

** p < 0,01 con respecto a su control



CONCLUSIONES



5 Conclusiones

De los resultados obtenidos en el trabajo experimental recogido en esta memoria se puede concluir:

1. La composición de las algas pone de manifiesto que su utilización en las dietas podría contribuir a lograr una nutrición equilibrada.
2. Las dietas que contienen algas son bien aceptadas por la rata Sprague-Dawley, dando lugar a que la ingesta y el crecimiento corporal sean adecuados.
3. El consumo habitual de Lechuga de mar, Wakame y Nori, podría resultar beneficioso frente al riesgo cardiovascular al disminuir los niveles de LDL-colesterol.
4. A partir de los niveles séricos analizados se puede deducir que la incorporación de las algas a la dieta no altera la función hepática ni renal.
5. Debido a los resultados contradictorios obtenidos en la actividad de las disacaridasas y en la glucemia serían necesarios estudios específicos para conocer mejor el comportamiento de la glucosa en una alimentación en la que se incluyan algas.

6. La repercusión del consumo de algas en la actividad de las peptidasas depende de la enzima, tipo de alga y órgano considerados.
7. El consumo de alga parda o roja mejora la capacidad antioxidante del organismo, alterando la actividad de las enzimas antioxidantes y su equilibrio, de manera que puede crear ambientes antioxidantes en el hígado, corazón y mucosa intestinal, generando de este modo un efecto protector en las células correspondientes.

Conclusión general

La incorporación de las algas a la dieta podría atenuar e incluso eliminar determinadas carencias alimentarias, así como agregar compuestos que redundan en una alimentación más saludable.



BIBLIOGRAFÍA



6 Bibliografía

Publicaciones derivadas de este trabajo:

- Taboada, M.C., Millán, R. y Míguez, M.I. (2010) Composition, nutritional aspects and effect on serum parameters of marine algae *Ulva rigida*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**: 445-449.
- Taboada, M.C., Millán, R. y Míguez, M.I. (2011) Evaluation of the marine alga *Ulva rigida* as a food supplement: effect of intake on intestinal, hepatic, and renal enzyme activities in rats. *Journal of Medicinal Food* **14**: 161-166.
- Taboada, M.C., Millán, R. y Míguez, M.I. (2013) Nutritional value of the marine algae Wakame (*Undaria pinnatifida*) and Nori (*Porphyra purpurea*) as food supplements. *Journal of Applied Phycology* **25**: 1271-1276.
- Taboada, M.C., Millán, R. y Míguez, M.I. (2013) Evaluation of marine algae *Undaria pinnatifida* and *Porphyra purpurea* as a food supplement: composition, nutritional value and effect of intake on intestinal, hepatic and renal enzyme activities in rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **93**: 1863-1868.

Referencias bibliográficas:

- Abbott, W.A. y Meister, A. (1983) Modulation of gamma-glutamyl transpeptidase activity by bile acids. *The Journal of Biological Chemistry* **258**: 6193-6197.
- Actis Dato, S.M. y Rebolledo, O.R. (2000) La glicación y glicosilación de las lipoproteínas: su importancia en la diabetes mellitus. *Medicina* **60**: 645-656.
- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* **105**: 121-126.
- Age-Related Eye Disease Study Research Group. (2001) A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report nº 8. *Archives of Ophthalmology* **119**: 1417-1436.
- Alpers, D.H. (1994) *Digestion and absorption of carbohydrates and proteins*. En: Physiology of the gastrointestinal tract. Johnson, L. y Alpers, D.H. (eds.), Raven Press, New York pp.1723-1751.
- AOAC. (1995) *Official methods of analysis*. Association of Official Analytical Chemists International.
- Arts, I.C., Hollman, P.C., Bueno, H.B., Feskens, E.J. y Kromhout, D. (2001) Dietary catechins and epithelial cancer incidence: the Zutphen elderly study. *International Journal of Cancer* **92**: 298-302.
- Asp, N.G., Koldovsky, O. y Hoskova, J. (1967) Use of the glucoseoxidase method for assay of disaccharidase activities in the small intestine--a limitation. *Physiologia Bohemoslovaca* **16**: 508-511.

- Asp, N.G., Dahlqvist, A. y Koldovsky, O. (1969) Human small-intestinal beta-galactosidases. Separation and characterization of one lactase and one hetero beta-galactosidase. *Biochemical Journal* **114**: 351-359.
- Babior, B.M., Kipnes, R.S. y Curnutte, J.T. (1973) Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *The Journal of Clinical Investigation* **52**: 741-744.
- Babior, B.M. (2000) Phagocytes and oxidative stress. *The American Journal of Medicine* **109**: 33-44.
- Balboa, E.M., Conde, E., Moure, A. Falqué, E., Domínguez, H. (2013) *In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chemistry* **138** (2/3): 1764-1785).
- Bárbara, I. y Cremades, J. (1987) *Guía de las algas del litoral gallego*. Editado por La Casa de las Ciencias, La Coruña.
- Barber, R., Braude, R. y Mitchell, K. (1953) Antibiotics and endocrine stimulants as promoters of growth in fattening pigs. *Chemistry & Industry* **17**: 410.
- Barja, G. (2002) Rate of generation of oxidative stress-related damage and animal longevity. *Free Radical Biology and Medicine* **33**: 1167-1172.
- Barsanti, L. y Gualtieri, P. (2014) *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. Editado por Taylor & Francis, CRC press, Boca Raton.
- Beauchamp, C. y Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**: 276-287.

- Beckman, J.S., Carson, M., Smith, C.D. y Koppenol, W.H. (1993) ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature* **364**: 584.
- Bedir, A., Özener, I. y Emerk, K. (1996) Urinary Leucine Amino-peptidase is a more sensitive indicator of early renal damage in non-insulin-dependent diabetics than microalbuminuria. *Nephron* **74**: 110-113.
- Bender, D.A. y Bender, A.E. (1997) *Nutrition a reference handbook*. Editado por Oxford University Press, Oxford.
- Beninger, P.G. y Lucas, A. (1984) Seasonal variations in condition, reproductive activity, and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Tapes decussatus* L. (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **79**: 19-37.
- Bhakuni, D.S. y Rawat, D.S. (2005) *Bioactive metabolites of marine algae, fungi and bacteria*. En: Bioactive marine natural products. Harris, D. (ed.), Springer y Anamaya Publishers, New Delhi pp. 1-25.
- Bligh, E.G. y Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**: 911-917.
- Bocanegra, A., Nieto, A., Blas, B. y Sánchez-Muniz, F.J. (2003) Diets containing a high percentage of Nori or Konbu algae are well-accepted and efficiently utilised by growing rats but induce different degrees of histological changes in the liver and bowel. *Food and Chemical Toxicology* **41**: 1473-1480.
- Bocanegra, A., Beneduí, J. y Sánchez-Muniz, F.J. (2006) Differential effects of konbu and nori seaweed dietary supplementation on liver glutathione status in normo-and hypercholesterolaemic growing rats. *British Journal of Nutrition* **95**: 696-702.

- Bocanegra, A., Bastida, S., Benedi, J., Rodenas, S. y Sánchez-Muniz, F.J. (2009) Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *Journal of Medicinal Food* **12**: 236-258.
- Boticario, C. y Cascales, M. (2012) *Innovaciones en cáncer*. Editado por la Universidad Nacional de Educación a Distancia, Madrid.
- Boulom, S., Robertson, J., Hamid, N., Ma, Q. y Lu, J. (2014) Seasonal changes in lipid, fatty acid, α -tocopherol and phytosterol contents of seaweed, *Undaria pinnatifida*, in the Marlborough Sounds, New Zealand. *Food Chemistry* **161**: 261-269.
- Boveris, A., Oshino, N. y Chance, B. (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochemical Journal* **128**: 617-630.
- Bressani, R. (1977) *Human assays and applications*. En: Evaluation of protein for humans. Bodwell, C.E. (ed.), Avi Publishing Company, Westport, Connecticut pp. 81-117.
- Bucala, R., Model, P. y Cerami, A. (1984) Modification of DNA by reducing sugars: a possible mechanism for nucleic acid aging and age-related dysfunction in gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**: 105-109.
- Bucala, R., Tracey, K.J. y Cerami, A. (1991) Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *The Journal of Clinical Investigation* **87**: 432-438.
- Bucala, R., Makita, Z., Koschinsky, T., Cerami, A. y Vlassara, H. (1993) Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 6434-6438.

- Burtin, P. (2003) Nutritional value of seaweeds. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* **2**: 498-503.
- Cabioc'h, J., Floc'h, J., Toquin, A., Boudouresque, C.F., Meinesz, A. y Verlaque, M. (2007) *Guía de las algas del Atlántico y del Mediterráneo: un estudio de las algas de los mares de Europa*. Ediciones Omega, Barcelona.
- Cáceres, E., García, M. L. y Selgas, M. D. (2004) La importancia de la fibra dietética. *Alimentación Nutrición y Salud* **11**(1): 6-16.
- Castelli, T. y Levitar, Y. (1977) Atherogenic index. *Current Prescribing*: 39.
- Castiñeira, R. (2011) *Guía visual de las algas marinas: del Parque Nacional Marítimo Terrestre de las Islas Atlánticas de Galicia*. Editado por el Instituto para la Conservación de la Naturaleza, Madrid.
- Cerviño, M.C. (2007) *Inhibición de la Proteína Quinasa C-beta mediante RNA antisentido y estudio de su función en la activación de células Jurkat*. Tesis, Departamento de Bioquímica, Universidad de Santiago de Compostela.
- Chance, B., Sies, H. y Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews* **59**: 527-605.
- Chen, H., Yan, X., Zhu, P. y Lin, J. (2006) Antioxidant activity and hepatoprotective potential of agaro-oligosaccharides in vitro and in vivo. *Nutrition Journal* **5** (31): 1-12.
- Cherubini, A., Polidori, M.C., Bregnocchi, M., Pezzuto, S., Cecchetti, R., Ingegneri, T., di Iorio, A., Senin, U. y Mecocci, P. (2000) Antioxidant profile and early outcome in stroke patients. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* **31**: 2295-2300.

- Chkhikvishvili, I.D. y Ramazanov, Z.M. (2000) Phenol compounds from brown algae and their antioxidant activity. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiya* **36**: 336-338.
- Choi, Y., Cho, S., Kim, H. y LEE, H. (1998) Effects of soluble dietary fibers on lipid metabolism and activities of intestinal disaccharidases in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **44**: 591-600.
- Christie, W.W. (1989) *Gas chromatography and lipids: a practical guide*. Christie, W.W., Bames, P.J. y asociados (eds.), The Oily Press, Ayr (Scotland).
- Chu, F.F. y Esworthy, S.R. (1995) The expression of an intestinal form of glutathione peroxidase (GSHPx-GI) in rat intestinal epithelium. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **323**: 288-294.
- Chu, F.F., Esworthy, R.S., Ho, Y.S., Bermeister, M., Swiderek, K. y Elliott, R.W. (1997) Expression and chromosomal mapping of mouse Gpx2 gene encoding the gastrointestinal form of glutathione peroxidase, GPX-GI. *Biomedical and Environmental Sciences* **10**: 156-162.
- Church, D.C, Pond, W.G. y Pond, K.R. (2002) Fundamentos de nutrición y alimentación de animales. Editado por Limusa Wiley, México.
- Clermont, G., Lecour, S., Lahet, J., Siohan, P., Vergely, C., Chevet, D., Rifle, G. y Rochette, L. (2000) Alteration in plasma antioxidant capacities in chronic renal failure and hemodialysis patients: a possible explanation for the increased cardiovascular risk in these patients. *Cardiovascular Research* **47**: 618-623.
- Cofrades, S., Lopez-Lopez, I., Bravo, L., Ruiz-Capillas, C., Bastida, S., Larrea, M.T. y Jimenez-Colmenero, F. (2010) Nutritional and antioxidant properties of different brown and red Spanish edible

- seaweeds. *Food Science and Technology International* **16**: 361-370.
- Cohen, S.A. y Michaud, D.P. (1993) Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* **211**: 279-287.
- Cohen, S.A. y De Antonis, K.M. (1994) Applications of amino acid derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate: analysis of feed grains, intravenous solutions and glycoproteins. *Journal of Chromatography A* **661**: 25-34.
- Colombo, M.L., Rise, P., Giavarini, F., DE Angelis, L., Galli, C. y Bolis, C.L. (2006) Marine macroalgae as sources of polyunsaturated fatty acids. *Plant Foods for Human Nutrition* **61**: 67-72.
- Connor, S.L., Gustafson, J.R., Artaud-Wild, S.M., Flavell, D.P., Classick-Kohn, C.J., Hatcher, L.F. y Connor, W.E. (1986) The cholesterol/saturated-fat index: an indication of the hypercholesterolaemic and atherogenic potential of food. *Lancet* **1**: 1229-1232.
- Cremades, J. (1997) *Las algas en España*. En: Las Algas, una alternativa de futuro. Editado por el Centre d'Etude et Valorisation des Algues de Francia y el Instituto Galego de Formación en Acuicultura. Fondo de Formación, Galicia: 31-39.
- Cremades, J., Bárbara, I. y Veiga, A.J. (1998) Las macroalgas marinas y sus aplicaciones. Editado por el Fondo de Promoción de Empleo, Ferrol.
- Dagnelie, P.C., van Staveren, W.A. y van den Berg, H. (1991) Vitamin B₁₂ from algae appears not to be bioavailable. *The American Journal of Clinical Nutrition* **53**: 695-697.

- Dahlqvist, A. (1968) Assay of intestinal disaccharidases. *Analytical Biochemistry* **22**: 99-107.
- Davies, P., Bailey, P.J., Goldenberg, M.M. y Ford-Hutchinson, A.W. (1984) The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *Annual Review of Immunology* **2**: 335-357.
- Davy, C., Brock, A., Walker, J. y Eichler, D. (1988) Tissue activities of enzymes of diagnostic interest in the marmoset and rat. *Journal of Comparative Pathology* **99**: 41-53.
- Dawczynski, C., Schubert, R. y Jahreis, G. (2007) Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chemistry* **103**: 891-899.
- de Haan, J.B., Cristiano, F., Iannello, R., Bladier, C., Kelner, M.J. y Kola, I. (1996) Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. *Human Molecular Genetics* **5**: 283-292.
- Díaz-Acosta, A.E. y Membrillo-Hernández, J. (2006) Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* **9**: 34-44.
- Dizdaroğlu, M. (1991) Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Biology and Medicine* **10**: 225-242.
- Dousip, A., Matanjun, P., Sulaiman, M.R., Tan, T.S., Ooi, Y.B.H. y Lim, T.P. (2014) Effect of seaweed mixture intake on plasma lipid and antioxidant profile of hypercholesterolaemic rats. *Journal of Applied Phycology* **26**: 999-1008.
- Dreher, D. y Junod, A. (1996) Role of oxygen free radicals in cancer development. *European Journal of Cancer* **32**: 30-38.

- Droy-Lefaix, M.T (1997) Effect of the antioxidant action of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) on aging and oxidative stress. *Age* **20**: 141-149
- Dwyer, J. (2012) *Necesidades nutricionales y valoración nutricional*. En: Harrison. Principios de Medicina Interna. Longo, D.L., Kasper, D.L., Jameson, J.L., Fauci, A.S., Hauser, S.L. y Loscalzo, J. (eds.), McGraw-Hill Interamericana, México 73 pp. 588-594
- Egashira, T., Nagai, T., Kimba, Y., Murayama, F., Goto, S., Kudo, Y., Sudo, S., Kono, T. y Yamanaka, Y. (1991) An injury of the liver caused by ischemia-reperfusion in rat liver. *Nihon Yakurigaku Zasshi. Folia Pharmacologica Japonica* **97**: 339-350.
- Esterbauer, H. y Cheeseman, K.H. (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology* **186**: 407-421.
- Falsini, B., Piccardi, M., Iarossi, G., Fadda, A., Merendino, E. y Valentini, P. (2003) Influence of short-term antioxidant supplementation on macular function in age-related maculopathy. A pilot study including electrophysiologic assessment. *Ophthalmology* **110**: 51-60.
- Fang, Y., Yang, S. y Wu, G. (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* **18**: 872-879.
- FAO (2004) *Alcance de la industria de las algas marinas*. En: El estado mundial de la pesca y la acuicultura. FAO. Editado por el Departamento de Pesca, Roma pp. 112-118.
- FAO. Departamento de Pesca y Acuicultura (2010) *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Editado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma.

- FAO (2014) *Examen mundial de la pesca y la acuicultura*. En: El estado mundial de la pesa y la acuicultura. Editado por la FAO pp. 3-107.
- Ferreiro, I.A., Acuña, R. y Durán, C. (1993) *As algas en Galicia: alimentación e outros usos*. Editado por la Dirección Xeral de Marisqueo e Acuicultura. Xunta de Galicia.
- Fleurence, J. (1999) Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science & Technology* **10**: 25-28.
- Fleurence, J. (2004) *Seaweed proteins*. En: Proteins in Food Processing. Yada, R. (ed.), Woodhead Publishing Limited y CRC Press, Cambridge pp. 197-213.
- Folch, J., Lees, M. y Sloane-Stanley, G. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* **226**: 497-509.
- Förster, U. y Wittmann, G.T.W. (1983) *Metal pollution in the aquatic environment*. Editado por Springer-Verlag, Berlin.
- Freile-Pelegrín, Y. y Robledo, D. (2014) *Bioactive Phenolic Compounds from Algae*. En: Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources. Hernández-Ledesma, B. y Herrero, M. (eds.), Yohn Wiley & Sons, Ltd., Oxford pp. 113-129.
- Friedewald, W.T., Levy, R.I. y Fredrickson, D.S. (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without us of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* **18**: 499-502.
- Friedman, M. (1996) Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**: 6-29.

- Fukushima, M., Ohashi, T., Sekikawa, M. y Nakano, M. (1999) Comparative hypocholesterolemic effects of five animal oils in cholesterol-fed rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **63**: 202-205.
- Galland-Irmouli, A., Fleurence, J., Lamghari, R., Luçon, M., Rouxel, C., Barbaroux, O., Bronowicki, J., Villaume, C. y Guéant, J. (1999) Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmata* (Dulse). *The Journal of Nutritional Biochemistry* **10**: 353-359.
- Ganesan, P., Kumar, C.S. y Bhaskar, N. (2008) Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresource Technology* **99**: 2717-2723.
- García, J. (2012) *Una alternativa sostenible para diversificar cultivos y proteger la calidad del medio marino*. En: Acuicultura multitrófica integrada. Una alternativa sostenible y de futuro para los cultivos marinos de Galicia. Guerrero, S. y Cremades, J. (eds.), Centro de Investigacións Mariñas da Consellería do Medio Rural e do Mar da Xunta de Galicia, Vilanova de Arousa (Pontevedra) pp. 8-19.
- García-Casal, M.N., Pereira, A.C., Leets, I., Ramirez, J. y Quiroga, M.F. (2007) High iron content and bioavailability in humans from four species of marine algae. *The Journal of Nutrition* **137**: 2691-2695.
- García-Casal, M.N., Ramirez, J., Leets, I., Pereira, A.C. y Quiroga, M.F. (2009) Antioxidant capacity, polyphenol content and iron bioavailability from algae (*Ulva sp.*, *Sargassum sp.* and *Porphyra sp.*) in human subjects. *British Journal of Nutrition* **101**: 79-85.
- García Tasende, M. (2011) *La explotación de macroalgas marinas en Galicia: situación actual y marco legal*. En: Las algas como recurso. Valorización. Aplicaciones industriales y tendencias. Editado por el Centro Tecnológico del Mar-Fundación CETMAR pp. 33-45.

- García Tasende, M. y Peteiro, C. (2015) Explotación de las macroalgas marinas: Galicia como caso de estudio hacia una gestión sostenible de los recursos. *Ambienta* **111**: 116-132.
- Garvey, T.Q., Hyman, P., E. e Isselbacher, K.J. (1976) Gamma-glutamyl transpeptidase of rat intestine: localization and possible role in amino acid transport. *Gastroenterology* **71**: 778-785.
- Glenn, J.V. y Stitt, A.W. (2009) The role of advanced glycation end products in retinal ageing and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1790**: 1109-1116.
- Goda, T. y Takase, S. (1994) Effect of dietary fat content on microvillus in rat jejunum. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **40**: 127-136.
- Goldbarg, J.A. y Rutenburg, A.M. (1958) The colorimetric determination of leucine aminopeptidase in urine and serum of normal subjects and patients with cancer and other diseases. *Cancer* **11**: 283-291.
- Gonzales, G.F. y Villena, A. (2002) Obesidad: Dietas hipocalóricas y el suplemento con aminoácidos. *Revista Peruana de Endocrinología y Metabolismo* **5** (1-2): 5-21.
- González, C., García, O. y Míguez, L. (1998) *Algas marañas de Galicia: biología, gastronomía, industria*. Colección Montes e Fontes. Editado por Edicións Xerais de Galicia, Vigo.
- González, M., Caride, B., Lamas, M.A. y Taboada, M.C. (2000) Effects of sea urchin-based diets on serum lipid composition and on intestinal enzymes in rats. *Journal of Physiology and Biochemistry* **56**: 347-352.
- Goñi, A.C.L., Blanco, D., Peña, A., Ronda, M., González, B.O., Arteaga, M.E., Bada, A.M., González, Y. y Mancebo, A. (2011) Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley

- producidas en CENPALAB, Cenp: SPRD. *REDV, Revista Electrónica de Veterinaria* **12** (11): 1-10.
- Gray, J. (2006) *Dietary fibre: definition, analysis, physiology & health*. Editado por el International Life Sciences Institute (ILSI), Europe Concise Monograph Series, Brussels.
- Groner, Y., Elroy-Stein, O., Bernstein, Y., Dafni, N., Levanon, D., Danciger, E. y Neer, A. (1986) Molecular genetics of Down's syndrome: overexpression of transfected human Cu/Zn-superoxide dismutase gene and the consequent physiological changes. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**: 381-393.
- Gustafson, J.M., Dodds, S.J., Burgus, R.C. y Mercer, L.P. (1986) Prediction of brain and serum free amino acid profiles in rats fed graded levels of protein. *The Journal of Nutrition* **116**: 1667-1681.
- Gutiérrez, I., Espinosa, A., García, J., Carabaño, R. y De Blas, J. (2002) Effect of levels of starch, fiber, and lactose on digestion and growth performance of early-weaned rabbits. *Journal of Animal Science* **80**: 1029.
- Guzik, T.J., Mussa, S., Gastaldi, D., Sadowski, J., Ratnatunga, C., Pillai, R. y Channon, K.M. (2002) Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **105**: 1656-1662.
- Halliwell, B.H. (1981) *Free radicals, oxygen toxicity and aging*. En: Age pigments. Sohal, R.S. (ed.), Elsevier pp. 1-62.
- Halliwell, B.H. y Gutteridge, J.M.C. (1988) Iron as a biological pro-oxidant. *ISI Atlas of Science-Biochemistry* **1**(1): 48-52.
- Halliwell, B.H. y Gutteridge, J.M.C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology* **186**: 1-85.

- Halliwell, B.H. (1999) Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Research* **31**: 261-272.
- Halliwell, B.H. (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, **141** (2): 312-322.
- Halliwell, B.H. y Gutteridge, J.M.C. (2007) *Free radicals in biology and medicine*. Editado por Oxford University Press, Oxford.
- Hansen, N.G. y Eggum, B.O. (1973) The biological value of proteins estimated from amino acid analyses. *Acta Agriculturae Scandinavica* **23**: 247-251.
- Hasan, M.R. y Chakrabarti, R. (2009) *Use of algae and aquatic macrophytes as feed in small-scale aquaculture: a review*. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 531, Roma.
- Hayakawa, E. y Lee, V.H. (1992) Aminopeptidase activity in the jejunal and ileal Peyer's patches of the albino rabbit. *Pharmaceutical Research* **9**: 535-540.
- Hedemann, M.S., Eskildsen, M., Lærke, H.N., Pedersen, C., Lindberg, J.E., Laurinen, P. y Knudsen, K. (2006) Intestinal morphology and enzymatic activity in newly weaned pigs fed contrasting fiber concentrations and fiber properties. *Journal of Animal Science* **84**: 1375-1386.
- Hegedus, M. (1989) Traditional and new concepts in protein evaluation of feeds: a review. *Acta Veterinaria Hungarica* **37**: 3-16.
- Heo, S., Park, E., Lee, K. y Jeon, Y. (2005) Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource Technology* **96**: 1613-1623.

- Hernández, T., Hernández, A. y Martínez, C. (1996) Proteins quality: concepts and evaluation. *Alimentaria* **274**: 27-37.
- Hodis, H.N., Mack, W.J., LaBree, L., Cashin-Hemphill, L., Sevanian, A., Johnson, R. y Azen, S.P. (1995) Serial coronary angiographic evidence that antioxidant vitamin intake reduces progression of coronary artery atherosclerosis. *Jama* **273**: 1849-1854.
- Holdt, S.L. y Kraan, S. (2011) Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology* **23**: 543-597.
- Holland, B., Unwin, I. y Buss, D. (1991) *Vegetables, herbs and spices*. En: The fifth supplement to McCance and Widdowson's. The Composition of Foods. Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom pp. 94-97.
- Houston, M. (2014). The role of nutrition and nutraceutical supplements in the treatment of hypertension. *World Journal of Cardiology* **6** (2): 38-66.
- Huang, P., Feng, L., Oldham, E.A., Keating, M.J. y Plunkett, W. (2000) Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature* **407**: 390-395.
- Huang, K., Liu, H., Chen, Z. y Xu, H. (2002) Role of selenium in cytoprotection against cholesterol oxide-induced vascular damage in rats. *Atherosclerosis* **162**: 137-144.
- Ikedo, I., Tanaka, K., Sugano, M., Vahouny, G.V. y Gallo, L.L. (1988) Inhibition of cholesterol absorption in rats by plant sterols. *Journal of Lipid Research* **29**: 1573-1582.
- İnal, M.E., Kanbak, G. y Sunal, E. (2001) Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clinica Chimica Acta* **305**: 75-80.

- İrkin, L.C. y Erduğan, H. (2014) Seasonal Evaluation of Chemical Composition of *Codium fragile* (Suringar) Hariot Distributed in Çanakkale Strait (Dardanelles)–Turkey. *Marine Science and Technology Bulletin* **3**: 1-4.
- Iso, H., Kobayashi, M., Ishihara, J., Sasaki, S., Okada, K., Kita, Y., Kokubo, Y. y Tsugane, S. (2006) Intake of fish and n-3 fatty acids and risk of coronary heart disease among Japanese the Japan Public Health Center-Based (JPHC) Study Cohort I. *Circulation* **113**: 195-202.
- Ito, K. y Hori, K. (1989) Seaweed: chemical composition and potential food uses. *Food Reviews International* **5**: 101-144.
- Jenkins, D., Wolever, T., Taylor, R.H., Barker, H., Fielden, H., Baldwin, J.M., Bowling, A.C., Newman, H.C., Jenkins, A.L. y Goff, D.V. (1981) Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *The American Journal of Clinical Nutrition* **34**: 362-366.
- Jiménez-Escrig, A. y Goñi, I. (1999) Evaluación nutricional y efectos fisiológicos de macroalgas marinas comestibles. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* **49**: 114-120.
- Kalt, W., McDonald, J. y Donner, H. (2000) Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity of processed lowbush blueberry products. *Journal of Food Science* **65**: 390-393.
- Karkowsky, A.M. y Orlowski, M. (1978) gamma-Glutamyl transpeptidase. Determination of specificity in the presence of multiple amino acid acceptors. *The Journal of Biological Chemistry* **253**: 1574-1581.
- Karlsson, K. y Marklund, S.L. (1988) Heparin-, dextran sulfate-and protamine-induced release of extracellular-superoxide dismutase to plasma in pigs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **967**: 110-114.

- Katan, M.B., Grundy, S.M., Jones, P., Law, M., Miettinen, T., Paoletti, R. y Participants, S.W. (2003) Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clinic Proceedings* **78**: 965-978.
- Kaur, M., Kaur, J., Ojha, S. y Mahmood, A. (1996) Dietary fat effects on brush border membrane composition and enzyme activities in rat intestine. *Annals of Nutrition and Metabolism* **40**: 269-276.
- Kawasaki, H. y Shimomura, K. (2015). Temporal design of taste and flavor: practical collaboration between chef and scientist. *Flavour* **4** (12): 1-4.
- Kessler, M., Acuto, O., Storelli, C., Murer, H., Müller, M. y Semenza, G. (1978) A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes. Their use in investigating some properties of D-glucose and choline transport systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **506**: 136-154.
- Kim, H.M., Wi, S.G., Jung, S., Song, Y. y Bae, H. (2015) Efficient approach for bioethanol production from red seaweed *Gelidium amansii*. *Bioresource Technology* **175**: 128-134.
- Kimura, T., Seto, A. y Yoshida, A. (1978a) Effect of diets on intestinal disaccharidase and leucine aminopeptidase activities in refed rats. *Journal of Nutrition* **108**: 1087-1097.
- Kimura, T., Shiosaka, S. y Yoshida, A. (1978b) Effect of dietary amino acids on jejunal sucrase and leucineaminopeptidase activities in rats. *Journal of Nutrition* **108**: 1098-1103.
- Kimura, T., Kato, T., Tsukazaki, K. y Yoshida, A. (1979) Effect of diets supplemented with amino acids on intestinal sucrase and leucine aminopeptidase activities in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **25**: 195-204.

- Kinsella, J., Lokesh, B., Croset, M., Black, M. y Surette, M. (1992) *Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids: effects on membrane enzyme activities and macrophage eicosanoid synthesis*. En: health effects of fish and fish oils. Chandra, R.K. (ed.), ARTS Biomedical Publisher and Distributions pp. 81-126.
- Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M. y Hocevar, B.A. (2010) Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicologic Pathology* **38**: 96-109.
- Kovacs, M., Anderson, W. y Ackman, R. (1979) A simple method for the determination of cholesterol and some plant sterols in fishery-based food products. *Journal of Food Science* **44**: 1299-1301.
- Krause, M. (1995) *Proteínas*. En: Nutrición y dietoterapia. Mahan, L.K. y Arlin M. (eds.), McGraw Hill-Interamericana, Mexico pp. 57-69.
- Kritchevsky, S.B., Shimakawa, T., Tell, G.S., Dennis, B., Carpenter, M., Eckfeldt, J.H., Peacher-Ryan, H. y Heiss, G. (1995) Dietary antioxidants and carotid artery wall thickness. The ARIC Study. Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Circulation* **92**: 2142-2150.
- Kumar, S.A., Magnusson, M., Ward, L.C., Paul, N.A. y Brown, L. (2015) Seaweed supplements normalise metabolic, cardiovascular and liver responses in high-carbohydrate, high-fat fed rats. *Marine drugs* **13**: 788-805.
- Küpper, F. C. (2015). *Iodine in Seaweeds: Two Centuries of Research*. En: Handbook of Marine Biotechnology. Kim S.K. (ed.), Springer, Berlin Heidelberg pp. 591-596.
- Lage-Yusty, M.A., Alvarado, G., Ferraces-Casais, P. y López-Hernández, J. (2014) Modification of bioactive compounds in dried seaweeds. *International Journal of Food Science & Technology* **49**: 298-304

- Lahrichi, M., Ratanasavanh, D., Galteau, M.M. y Siest, G. (1982) Effect of chronic ethanol administration on gamma-glutamyltransferase activities in plasma and in hepatic plasma membranes of male and female rats. *Enzyme* **28**: 251-257.
- Landmesser, U., Merten, R., Spiekermann, S., Buttner, K., Drexler, H. y Hornig, B. (2000) Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation* **101**: 2264-2270.
- Landmesser, U., Spiekermann, S., Dikalov, S., Tatge, H., Wilke, R., Kohler, C., Harrison, D.G., Hornig, B. y Drexler, H. (2002) Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* **106**: 3073-3078.
- Lawrence, R.A. y Burk, R.F. (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **71**: 952-958.
- Lee, J., Koo, N. y Min, D. (2004) Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **3**: 21-33.
- Leibovitz, B.E. y Siegel, B.V. (1980) Aspects of free radical reactions in biological systems: aging. *Journal of Gerontology* **35**: 45-56.
- Lesgourgues, B., Nalpas, B. y Berthelot, P. (1984) Gamma-glutamyl-transferase: un test simple, une interprétation délicate. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* **8**: 99-102.
- Levine, R.L., Mosoni, L., Berlett, B.S. y Stadtman, E.R. (1996) Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 15036-15040.

- Llera, E.M. y Álvarez, J. (2007) *Algas marinas de Asturias*. Editado por la Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio e Infraestructuras. Oviedo (Asturias).
- López Torres, M. (2002) *Efectos de la manipulación de antioxidantes enzimáticos endógenos y de la edad a lo largo del ciclo vital de "Rana perezi", en relación con los radicales de oxígeno*. Tesis. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.
- Lourenço, R. y Camilo, M.E. (2002) Taurine: a conditionally essential amino acid in humans? An overview in health and disease. *Nutrición Hospitalaria* **17**: 262-270.
- Lourenço, S.O., Barbarino, E., De-Paula, J.C., Pereira, Luis Otávio da S y Marquez, U.M.L. (2002) Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycological Research* **50**: 233-241.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) Protein mesasurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* **193**: 267-275.
- Mabeau, S., Cavaloc, E., Fleurence, J. y Lahaye, M. (1992) New seaweed based ingredients for the food industry. *International Food Ingredients* **3**: 38-45.
- Mabeau, S. y Fleurence, J. (1993) Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends in Food Science & Technology* **4**: 103-107.
- MacArtain, P., Gill, C.I., Brooks, M., Campbell, R. y Rowland, I.R. (2007) Nutritional value of edible seaweeds. *Nutrition Reviews* **65**: 535-543.
- Macarulla, M.T. y Portillo, M.P. (1998) *Utilización nutritiva de proteínas y evaluación biológica de la calidad de la proteína*. En:

- Fundamentos teórico-prácticos de nutrición y dietética. Martínez, J.A. y Arenas, J.C. (eds.), McGraw-Hill Interamericana: 151-157.
- Mahfouz, M.M. y Kummerow, F.A. (2000) Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides, and antioxidant enzymes in rats and rabbits. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **11**: 293-302.
- Manju, V., Kalaivani Sailaja, J. y Nalini, N. (2002) Circulating lipid peroxidation and antioxidant status in cervical cancer patients: a case-control study. *Clinical Biochemistry* **35**: 621-625.
- Mann, J., Cummings, J., Englyst, H., Key, T., Liu, S., Riccardi, G., Summerbell, C., Uauy, R., Van Dam, R. y Venn, B. (2007) FAO/WHO scientific update on carbohydrates in human nutrition: conclusions. *European Journal of Clinical* **61**: S132-S137.
- Marcus, D.L., Thomas, C., Rodriguez, C., Simberkoff, K., Tsai, J.S., Strafaci, J.A. y Freedman, M.L. (1998) Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Experimental Neurology* **150**: 40-44.
- Markert, M., Andrews, P.C. y Babior, B.M. (1984) Measurement of O₂-production by human neutrophils. The preparation and assay of NADPH oxidase-containing particles from human neutrophils. *Methods in Enzymology* **105**: 358-365.
- Marsham, S., Scott, G.W. y Tobin, M.L. (2007) Comparison of nutritive chemistry of a range of temperate seaweeds. *Food chemistry* **100**(4): 1331-1336.
- Maruyama, H., Watanabe, K. y Yamamoto, I. (1991) Effect of dietary kelp on lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity in livers of rats given breast carcinogen DMBA. *Nutrition and Cancer* **15**: 221-228.

- Mataix, J. (2004) *Lípidos alimentarios*. En: Libro blanco de los Omega 3. Mataix, J. y Gil, A. (eds.), Instituto omega-3-Puleva Food. Editorial Médica Panamericana, Madrid **3**: 14-32.
- Matanjun, P., Mohamed, S., Mustapha, N.M., Muhammad, K. y Ming, C.H. (2008) Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. *Journal of Applied Phycology* **20**: 367-373.
- McCarthy, D.M., Nicholson, J.A. y Kim, Y.S. (1980) Intestinal enzyme adaptation to normal diets of different composition. *The American Journal of Physiology* **239**: G445-51.
- McCord, J.M. y Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry* **244**: 6049-6055.
- McHugh, D.J. (2002) *Perspectivas para la producción de algas marinas en los países en desarrollo*. FAO, Roma.
- McLachlan, J. (1985) Macroalgae (seaweeds): industrial resources and their utilization. *Plant and Soil* **89**: 137-157.
- Meister, A., Tate, S.S. y Griffith, O.W. (1981) Gamma-glutamyl transpeptidase. *Methods in Enzymology* **77**: 237-253.
- Melov, S., Ravenscroft, J., Malik, S., Gill, M.S., Walker, D.W., Clayton, P.E., Wallace, D.C., Malfroy, B., Doctrow, S.R. y Lithgow, G.J. (2000) Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science* **289**: 1567-1569.
- Méndez, J.D. (2003) Productos finales de glicación avanzada y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Gaceta Médica de México* **139**: 49-55.
- Menéndez, J.L. y Fernández, R.R. (2005) Las algas, los vegetales del mar. *Asturnatura.com* [en línea] Num. 10.

- Miller, D.S. y Bender, A.E. (1955) The determination of the net utilization of proteins by a shortened method. *British Journal of Nutrition* **9**: 382-388.
- Miller, D.I. (1981) Disaccharidase activities. *The American Journal of Clinical Nutrition* **34**: 1153-1154.
- Miller, R.A. (1996) *Aging and the immune response*. En: Handbook of the Biology of Aging. Scheneider, E. y Rowe, J. (eds.), Academic Press pp. 355-392.
- Mitchell, H.H. (1924) A method of determining the biological value of protein. *Journal of Biological Chemistry* **58**: 873-903.
- Mitchell, H.H. y Block, R.J. (1946) Some relationships between the amino acid contents of proteins and their nutritive values for the rat. *The Journal of Biological Chemistry* **163**: 599-620.
- Mitchell, H. H.(1954) *The dependence of the biological value of food proteins upon their content of essential amino acids*. En: Die Bewertung der Futterstoffe und andere problem der tieresnahrung. Nehring, K. (ed.) Deutsche Akademie der Landwirt schaftswissen schaften, Berlin **2** pp. 279-325.
- Miyata, T., Oda, O., Inagi, R., Iida, Y., Araki, N., Yamada, N., Horiuchi, S., Taniguchi, N., Maeda, K. y Kinoshita, T. (1993) Beta 2-Microglobulin modified with advanced glycation end products is a major component of hemodialysis-associated amyloidosis. *The Journal of Clinical Investigation* **92**: 1243-1252.
- Montagne, L., Pluske, J. y Hampson, D. (2003) A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Animal Feed Science and Technology* **108**: 95-117.

- Mouritsen, O. G., Williams, L., Bjerregaard, R. y Duelund, L. (2012). Seaweeds for umami flavour in the New Nordic Cuisine. *Flavour* **1** (4): 1-12.
- Muñños, A. (2009) Las algas marinas en la gastronomía. *Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas* **11**: 163-168.
- Muñoz-Calvo, R. y del Pino-Martinez, P. (1982) Significance of endogenous intestinal nitrogen. *Revista Española de Fisiología* **38**: 185-188.
- Murata, M. y Nakazoe, J. (2001) Production and use of marine algae in Japan. *Japan Agricultural Research Quarterly* **35**: 281-290.
- Murray, H.W. y Nathan, C.F. (1999) Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *The Journal of Experimental Medicine* **189**: 741-746.
- Nielsen, M.M., Bruhn, A., Rasmussen, M.B., Olesen, B., Larsen, M.M. y Møller, H.B. (2012) Cultivation of *Ulva lactuca* with manure for simultaneous bioremediation and biomass production. *Journal of Applied Phycology* **24**: 449-458.
- Nisizawa, K., Noda, H., Kikuchi, R. y Watanabe, T. (1987) The main seaweed foods in Japan. *Hidrobiología* **151** (152): 5-29.
- Nova, E., Ramos, E. y Marcos, A. (2010) *Alimentos funcionales*. En: Tratado de nutrición. Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos. Hernandez, A.D.G. (ed.), Editorial Médica Panamericana, Madrid **2** (17): 453-476.
- Nyström, T. (2005) Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *The European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal* **24**: 1311-1317.

- Oberley, T. y Oberley, L. (1997) Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histology and Histopathology* **12**: 525-535.
- Ohata, M. y Toda, G. (2001) Gamma-glutamyltranspeptidase (gamma-GT). *Rinsho byori. The Japanese Journal of Clinical Pathology* **116**: 62-71.
- O'Keefe, S.F. (2008) *Nomenclature and Classification of Lipids*. En: Food lipids: Chemistry, nutrition and biotechnology. Akoh, C.C. y Min, D.B. (eds.), Marcel Dekker, Inc., New York pp. 3-35.
- Olin, K.L., Shigenaga, M.K., Ames, B.N., Golub, M.S., Gershwin, M.E., Hendrickx, A.G. y Keen, C.L. (1993) Maternal dietary zinc influences DNA strand break and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in infant rhesus monkey liver. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **203**: 461-466.
- Oltra, A.M., Carbonell, F., Tormos, C., Iradi, A. y Sáez, G.T. (2001) Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia. *Free Radical Biology and Medicine* **30**: 1286-1292.
- OMS-FAO (1985) *Necesidades de energía y de proteínas*. En: Serie de Informes Técnicos 724. Editado por la OMS-FAO, Ginebra.
- OMS-FAO (2003) *Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas*. En: Serie de Informes Técnicos 916. Editado por la OMS-FAO, Ginebra.
- OMS-FAO (2007) *Protein and amino acid requirements in human nutrition*. En: Technical Report Series 935. Editado por la OMS-FAO, Ginebra.
- Orr, W.C. y Sohal, R.S. (1994) Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* **263**: 1128-1130.

- Ortega-Calvo, J., Mazuelos, C., Hermosin, B. y Sáiz-Jiménez, C. (1993) Chemical composition of *Spirulina* and eukaryotic algae food products marketed in Spain. *Journal of Applied Phycology* **5**: 425-435.
- Ortiz, J., Romero, N., Robert, P., Araya, J., Lopez-Hernandez, J., Bozzo, C., Navarrete, E., Osorio, A. y Rios, A. (2006) Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. *Food Chemistry* **99**: 98-104.
- Ortiz, J., Uquiche, E., Robert, P., Romero, N., Quitral, V. y Llantén, C. (2009) Functional and nutritional value of the Chilean seaweeds *Codium fragile*, *Gracilaria chilensis* and *Macrocystis pyrifera*. *European Journal of Lipid Science and Technology* **111**: 320-327.
- Osborne, T.B., Mendel, L.B. y Ferry, E.L. (1919) A method of expressing numerically the growth-promoting value of proteins. *Journal of Biological Chemistry* **37** (2): 223-229.
- O'Shanahan, L. y Vela, E. (2003) Efectos de un vertido de aguas residuales sobre una comunidad bentónica del litoral de Telde, NE de Gran Canaria (Islas Canarias). *Vieraea* **31**: 253-266.
- Pádua, M., Fontoura, P.S.G. y Mathias, ÁL. (2004) Chemical composition of *Ulvaria oxysperma* (Kützinger) bliding, *Ulva lactuca* (Linnaeus) and *Ulva fasciata* (Delile). *Brazilian Archives of Biology and Technology* **47**: 49-55.
- Paglia, D.E. y Valentine, W.N. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **70**: 158-169.
- Paiva, L.S., Lima, E., Baptista, J.A., Patarra, R.F. y Neto, A.I. (2012) Azorean macroalgae as a food supplement: determination of proteins, fiber, and total of lipids and carbohydrates content. En: Qualidade dos alimentos: novos desafios. 11º Encontro de Química

- dos Alimentos. Editado por el Instituto Politécnico de Bragança (Portugal) p. 181.
- Paiva, L.S., Lima, E., Patarra, R.F., Neto, A.I. y Baptista, J. (2014) Edible Azorean macroalgae as source of rich nutrients with impact on human health. *Food Chemistry* **164**: 128-135.
- Palmer, R.M., Ferrige, A. y Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**: 524-526.
- Pamplona, R., Bellmunt, M., Portero, M. y Prat, J. (1993) Mechanisms of glycation in atherogenesis. *Medical Hypotheses* **40**: 174-181.
- Park, P., Kim, E., Lee, S., Park, S., Kang, D., Jung, B., Kim, K., Je, J. y Ahn, C. (2009) Protective effects against H₂O₂-induced damage by enzymatic hydrolysates of an edible brown seaweed, sea tangle (*Laminaria japonica*). *Journal of Medicinal Food* **12**: 159-166.
- Parks, D.A. y Booyse, F.M. (2002) Cardiovascular protection by alcohol and polyphenols. *Annals of the New York Academy of Sciences* **957**: 115-121.
- Parsons, A.F. (1996) Recent developments in kainoid amino acid chemistry. *Tetrahedron* **52**: 4149-4174.
- Pellett, P.L. (1978) Protein Quality Evaluation Revisited. *Food Technology*. **32** (5): 60-79.
- Pereira, L. (2011) A review of the nutrient composition of selected edible seaweeds. *Seaweed: Ecology, Nutrient Composition and Medicinal Uses*: 15-47.
- Pérez-Cirera, J., Salinas, J.M., Cremades, J., Bárbara, I., Granja, A., Veiga, A. y Fuertes, C. (1996) Cultivo de *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) en Galicia. *NACC: Nova Acta Científica Compostelana (Biología)* **7**: 3-28.

- Pertyńska-Marczewska, M., Głowacka, E., Sobczak, M., Cypryk, K. y Wilczyński, J. (2009) Glycation endproducts, soluble receptor for advanced glycation endproducts and cytokines in diabetic and non-diabetic pregnancies. *American Journal of Reproductive Immunology* **61**: 175-182.
- Picard, S., Parthasarathy, S., Fruebis, J. y Witztum, J.L. (1992) Aminoguanidine inhibits oxidative modification of low density lipoprotein protein and the subsequent increase in uptake by macrophage scavenger receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 6876-6880.
- Piironen, V., Toivo, J., Puupponen-Pimiä, R. y Lampi, A. (2003) Plant sterols in vegetables, fruits and berries. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**: 330-337.
- Plat, J. y Mensink, R.P. (2005) Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects. *The American Journal of Cardiology* **96**: 15-22.
- Plaza, M., Cifuentes, A. e Ibáñez, E. (2008) In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science & Technology* **19**: 31-39.
- Polavarapu, R., Spitz, D.R., Sim, J.E., Follansbee, M.H., Oberley, L.W., Rahemtulla, A. y Nanji, A.A. (1998) Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant enzyme function is associated with pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease in rats fed diets high in corn oil and fish oil. *Hepatology* **27**: 1317-1323.
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V. y Casini, A.F. (2003) The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology* **66**: 1499-1503.

- Poullain, M.G., Cezard, J.P., Marche, C., Roger, L., Mendy, F. y Broyart, J.P. (1989) Dietary whey proteins and their peptides or amino acids: effects on the jejunal mucosa of starved rats. *The American Journal of Clinical Nutrition* **49**: 71-76.
- Preuss, H. y Clouatre, D. L (2003) *Sodium, chloride and potassium*. En: Present knowledge in nutrition. Erdman Jr., J.W., Macdonald, I.A. y Zeisel, S.Z. (eds.), John Wiley & Sons, Iowa **31** pp. 475-492.
- Qasim, R. (1991) Amino acid composition of some common seaweeds. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* **4**: 49-54.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M. y Freeman, B.A. (1991) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **288**: 481-487.
- Raghavendran, H.R.B., Sathivel, A. y Devaki, T. (2005) Antioxidant effect of *Sargassum polycystum* (Phaeophyceae) against acetaminophen induced changes in hepatic mitochondrial enzymes during toxic hepatitis. *Chemosphere* **61**: 276-281.
- Rajadurai, M.R. (1990) *Production, marketing and trade of seaweeds*. En: Technical resource papers regional workshop on the culture and utilization of seaweeds Volume II. Editado por el Fisheries and Aquaculture Department, FAO, Cebu City (Philippines).
- Ramasamy, R., Yan, S.F., D'Agati, V. y Schmidt, A.M. (2007) Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): a formidable force in the pathogenesis of the cardiovascular complications of diabetes & aging. *Current Molecular Medicine* **7**: 699-710.
- Ramírez-Higuera, A., Quevedo-Corona, L., Paniagua-Castro, N., Chamorro-Ceballos, G., Milliar-García, A. y Jaramillo-Flores, M.E. (2014) Antioxidant enzymes gene expression and

- antihypertensive effects of seaweeds *Ulva linza* and *Lessonia trabeculata* in rats fed a high-fat and high-sucrose diet. *Journal of Applied Phycology* **26**: 597-605.
- Rauma, A., Torronen, R., Hanninen, O. y Mykkanen, H. (1995) Vitamin B-12 status of long-term adherents of a strict uncooked vegan diet ("living food diet") is compromised. *The Journal of Nutrition* **125** (10): 2511-2515.
- Rebolledo-Varela, E. y Fernandez-Otero, P.M. (1982) Effect of various fish meals on disaccharidases and alkaline phosphatase of the small intestine in rats. *Revista Española de Fisiología* **38**: 321-325.
- Riemersma, R., Wood, D., Oliver, M., Elton, R., Macintyre, C. y Gey, K. (1991) Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamins A, C, and E and carotene. *The Lancet* **337**: 1-5.
- Robinson, M.A., Herron, A.J., Goodwin, B.S. y Grill, R.J. (2012) Suprapubic bladder catheterization of male spinal-cord-injured Sprague-Dawley rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science (JAALAS)* **51**: 76-82.
- Rodrigues, D., Freitas, A.C., Pereira, L., Rocha-Santos, T.A., Vasconcelos, M.W., Roriz, M., Rodríguez-Alcalá, L.M., Gomes, A.M. y Duarte, A.C. (2015) Chemical composition of red, brown and green macroalgae from Buarcos bay in Central West Coast of Portugal. *Food Chemistry* **183**: 197-207.
- Rong, Y., Doctrow, S.R., Tocco, G. y Baudry, M. (1999) EUK-134, a synthetic superoxide dismutase and catalase mimetic, prevents oxidative stress and attenuates kainate-induced neuropathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 9897-9902.
- Roughead, Z.K., Johnson, L.K. y Hunt, J.R. (1999) Dietary copper primarily affects antioxidant capacity and dietary iron mainly affects iron status in a surface response study of female rats fed

- varying concentrations of iron, zinc and copper. *The Journal of Nutrition* **129**: 1368-1376.
- Ruiz-Roso, B. (2013) *Hidratos de carbono y fibra dietética*. En: Libro Blanco de la nutrición en España. Editado por la Fundación Española de la Nutrición (FEN) pp. 135-143.
- Ruperez, P. y Saura-Calixto, F. (2001) Dietary fibre and physicochemical properties of edible Spanish seaweeds. *European Food Research and Technology* **212**: 349-354.
- Sakurai, T. y Tsuchiya, S. (1988) Superoxide production from nonenzymatically glycated protein. *FEBS letters* **236**: 406-410.
- Sánchez-Machado, D.I., López-Hernández, J. y Paseiro-Losada, P. (2002) High-performance liquid chromatographic determination of α -tocopherol in macroalgae. *Journal of Chromatography A* **976**: 277-284.
- Sánchez-Machado, D.I., López-Cervantes, J., López-Hernández, J. y Paseiro-Losada, P. (2004a) Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chemistry* **85**: 439-444.
- Sánchez-Machado, D.I., López-Hernández, J., Paseiro-Losada, P. y López-Cervantes, J. (2004b) An HPLC method for the quantification of sterols in edible seaweeds. *Biomedical Chromatography* **18**: 183-190.
- Sanjurjo, P. (2007) Colesterol y prevención de la enfermedad cardiovascular. *Osasunaz* **8**: 89-103.
- Santiago Caamaño, J., Durán Neira, C. y Acuña Castroviejo, R. (1990) Aparición de *Undaria pinnatifida* en las costas de Galicia (España). Un nuevo caso en la problemática de introducción de especies foráneas. *Informes técnicos del Centro de Investigaciones Submarinas* **3**: 1-45.

- Santidrián, S. (1988) Digestión de las proteínas y absorción y metabolismo de los aminoácidos. *Offarm* **7** (8): 59-70.
- Schneeman, P.L. y Farness, A.O. (1982) Effects of dietary cellulose, pectin and oat bran on the small intestine in the rat. *The Journal of Nutrition* **112**: 1315-1319.
- Schultz, A.R. (2014) *Derivados cárnicos con algas: implicaciones sobre el metabolismo lipoproteico, estatus antioxidante y protección hepática*. Tesis. Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- Scott, R., Reddy, K., Husain, K., Schlorff, E., Rybak, L. y Somani, S. (2000) Dose response of ethanol on antioxidant defense system of liver, lung, and kidney in rat. *Pathophysiology* **7**: 25-32.
- Simopoulos, A.P. (2008) The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine* **233**: 674-688.
- Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients*, **5** (4): 1417-1435.
- Smart, C.E., Evans, M., O'Connell, S.M., McElduff, P., Lopez, P.E., Jones, T.W., Davis, E.A. y King, B.R. (2013) Both dietary protein and fat increase postprandial glucose excursions in children with type 1 diabetes, and the effect is additive. *Diabetes Care* **36**: 3897-3902.
- Smit, A.J. (2004) Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. *Journal of Applied Phycology* **16**: 245-262.
- Somani, S.M., Husain, K. y Schlorff, E.C. (1997) *Response of antioxidant system to physical and chemical stress*. En: Oxidants,

- antioxidants, and free radicals. Baskin, S.I. y Salem, H. (eds.), Taylor & Francis **6** pp. 125-141.
- Study Group of European Atherosclerosis Society. (1988) The recognition and management of hyperlipidemia in adults: a policy statement of the European Atherosclerosis Society. *European Heart Journal* **9**: 571-600.
- Sullivan, J.F., Jetton, M.M., Hahn, H.K. y Burch, R.E. (1980) Enhanced lipid peroxidation in liver microsomes of zinc-deficient rats. *The American Journal of Clinical Nutrition* **33**: 51-56.
- Taboada, M.C., González, M. y Rodríguez, E. (2003) Value and effects on digestive enzymes and serum lipids of the marine invertebrate *Holothuria forskali*. *Nutrition Research* **23**: 1661-1670.
- Taboada, M.C., Millán, R. y Míguez, M.I. (2006) *Unusual seafood products with potential food value*. En: Trends in Nutrition Research. Starks, T.S. (ed.), Nova Publishers pp. 123-145.
- Takamatsu, S., Takamatsu, M., Satoh, K., Imaizumi, T., Yoshida, H., Hiramoto, M., Koyama, M., Ohgushi, Y. y Mizuno, S. (1995) Effects on health of dietary supplementation with 100 mg d-alpha-tocopheryl acetate, daily for 6 years. *The Journal of International Medical Research* **23**: 342-357.
- Tas, S., Celikler, S., Ziyank-Ayvalik, S., Sarandol, E. y Dirican, M. (2011) *Ulva rigida* improves carbohydrate metabolism, hyperlipidemia and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochemistry and Function* **29**: 108-113.
- Tate Jr, D.J., Miceli, M.V. y Newsome, D.A. (1999) Zinc protects against oxidative damage in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Free Radical Biology and Medicine* **26**: 704-713.
- Temler, R.S., Dormond, C.A., Simon, E. y Morel, B. (1984) The effect of feeding soybean trypsin inhibitor and repeated injections of

- cholecystokinin on rat pancreas. *The Journal of Nutrition* **114**: 1083-1091.
- Thomas, K. (1909) Über die biologische Wertigkeit der Stickstoffsubstanzen in verschiedenen Nahrungsmitteln. *Archiv für Anatomie und Physiologie* **2/3**: 219-302.
- Thompson, G.A. y Meister, A. (1977) Interrelationships between the binding sites for amino acids, dipeptides, and gamma-glutamyl donors in gamma-glutamyl transpeptidase. *The Journal of Biological Chemistry* **252**: 6792-6798.
- Torres, A. y Cannata, J. (2003) *Metabolismo calcio fósforo y sus alteraciones*. En: Nefrología Clínica. Hernando, L., Aljama, P., Arias, M., Caramelo, C., Egido J. y Lamas. S. (eds.), Editorial Médica Panamericana, Madrid pp. 91-101.
- Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J. y Hiai, H. (1995) Persistent oxidative stress in cancer. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters* **358**: 1-3.
- Urbano, M.G. y Goñi, I. (2002) Bioavailability of nutrients in rats fed on edible seaweeds, Nori (*Porphyra tenera*) and Wakame (*Undaria pinnatifida*), as a source of dietary fibre. *Food Chemistry* **76**: 281-286.
- Urrialde de Andrés, R. (2003) *Las grasas en nuestra dieta. Ácidos grasos omega 3*. En: Nuevos alimentos para nuevas necesidades. Editado por el Servicio de Promoción de la Salud Instituto de Salud Pública Consejería de Sanidad **3** pp. 55-70.
- Valenzuela, R. y Ronco, A.M. (2007) Acrilamida en los alimentos. *Revista Chilena de Nutrición* **34**: 8-16.
- van Ginneken, V.J., Helsper, J., de Visser, W., van Keulen, H. y Brandenburg, W.A. (2011) Polyunsaturated fatty acids in various

- macroalgal species from north Atlantic and tropical seas. *Lipids in health and disease* **10**: 104-112.
- Van Wart, H.E. y Lin, S.H. (1981) Metal binding stoichiometry and mechanism of metal ion modulation of the activity of porcine kidney leucine aminopeptidase. *Biochemistry* **20**: 5682-5689.
- Verstraeten, S.V., Nogueira, L.V., Schreier, S. y Oteiza, P.I. (1997) Effect of trivalent metal ions on phase separation and membrane lipid packing: role in lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **338**: 121-127.
- Verstraeten, S.V., Keen, C., Golub, M. y Oteiza, P. (1998) Membrane composition can influence the rate of Al^{+3} -mediated lipid oxidation: effect of galactolipids. *Biochemical Journal* **333**: 833-838.
- Watanabe, F. (2007) Vitamin B₁₂ sources and bioavailability. *Experimental Biology and Medicine* **232**: 1266-1274.
- Wijesekara, I., Pangestuti, R. y Kim, S. (2011) Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers* **84**: 14-21.
- Wilke, T., Faulkner, S., Murphy, L., Kealy, L., Kraan, S. y Brouns, F. (2015) Seaweed enrichment of feed supplied to farm-raised Atlantic salmon (*Salmo salar*) is associated with higher total fatty acid and LC n-3 PUFA concentrations in fish flesh. *European Journal of Lipid Science and Technology* **117** (6): 767-772.
- Wrolstad, R.E., Decker, E.A., Schwartz, S.J. y Sporns, P. (2005) *Handbook of food analytical chemistry, water, proteins, enzymes, lipids, and carbohydrates*. Wrolstad, R.E., Acree, T., Decker, E.A., Penner, M.H., Reid, D.S., Schwartz, S.J., Shoemaker, C.F., Smith, D.M. y Sporns, P. (eds.), John Wiley & Sons, New Jersey.

- Yasunari, K., Maeda, K., Nakamura, M. y Yoshikawa, J. (2002) Oxidative stress in leukocytes is a possible link between blood pressure, blood glucose, and C-reacting protein. *Hypertension* **39**: 777-780.
- Yuan, Y.V., Bone, D.E. y Carrington, M.F. (2005) Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmata*) extract evaluated in vitro. *Food Chemistry* **91**: 485-494.
- Zaragozá, M., López, D., P. Sáiz, M., Poquet, M., Pérez, J., Puig-Parellada, P., Marmol, F., Simonetti, P., Gardana, C. y Lerat, Y. (2008) Toxicity and antioxidant activity in vitro and in vivo of two *Fucus vesiculosus* extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 7773-7780.
- Zarzuelo, A. y Gálvez, J. (2010) *Fibra alimentaria*. En: Tratado de nutrición. Composición y Calidad Nutritiva de los alimentos. Gil, A. (ed.), Editorial Médica Panamericana, Madrid **2** (9) pp. 233-256.
- Zhang, Q., Li, N., Zhou, G., Lu, X., Xu, Z. y Li, Z. (2003) In vivo antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) in aging mice. *Pharmacological Research* **48**: 151-155.
- Zhang, Q., Li, N., Liu, X., Zhao, Z., Li, Z. y Xu, Z. (2004) The structure of a sulfated galactan from *Porphyra haitanensis* and its in vivo antioxidant activity. *Carbohydrate Research* **339**: 105-111.
- Zorrilla, A.E., Eirez, M. e Izquierdo, M. (2004) Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* **23**: 51-57.

En este estudio se analiza cómo influye la ingesta de las algas marinas *Porphyra purpurea*, *Undaria pinnatifida*, *Himanthalia elongata*, *Ulva rigida* y *Codium tomentosum* en la calidad nutritiva del alimento y en diversos parámetros hemáticos. Debido a que las enzimas implicadas en los procesos digestivos se adaptan a la dieta, se analiza el efecto del consumo de un alga verde, una parda y una roja en la actividad de las enzimas disacaridasas: maltasa, sacarasa y lactasa; así como en la actividad enzimática leucino aminopeptidasa y gamma-glutamyl transpeptidasa en mucosa intestinal, hígado y riñón, órganos fundamentales en el metabolismo. Teniendo en cuenta que la composición de las algas incluidas en la dieta puede modular la producción de radicales libres, se valora, en los órganos antes mencionados, su influencia sobre la peroxidación lipídica y sobre la actividad de enzimas antioxidantes, tales como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, como mecanismo endógeno que protege del daño oxidativo

